

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Implication du monoxyde d'azote dans le développement de l'obésité chez la souris:  
altérations morpho-fonctionnelles du foie et du tissu adipeux

Federici, Gabrielle

*Award date:*  
2015

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**UNIVERSITE DE NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**IMPLICATION DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LE DEVELOPPEMENT DE  
L'OBESITE CHEZ LA SOURIS: ALTERATIONS MORPHO-FONCTIONNELLES DU  
FOIE ET DU TISSU ADIPEUX**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Gabrielle FEDERICI

Janvier 2015



## **Implication du monoxyde d'azote dans le développement de l'obésité chez la souris: altérations morpho-fonctionnelles du foie et du tissu adipeux.**

FEDERICI Gabrielle

### Résumé

Actuellement, l'obésité et le syndrome métabolique en général sont des problèmes majeurs de santé publique, principalement dans les sociétés industrialisées. Le syndrome métabolique est complexe et multifactoriel car il regroupe un ensemble de symptômes tels qu'une résistance à l'insuline, de l'hypertension ou des troubles du métabolisme des lipides menant à l'obésité. Dans notre étude, nous avons étudié l'obésité et ses conséquences sur un modèle de souris C57BL/6. Pendant 16 semaines, ces souris ont été nourries avec de la nourriture riche en lipide (HFD) ou contenant peu de lipides (LFD). De plus, chacun de ces groupes a reçu un inhibiteur spécifique de la iNOS, le L-NIL. Une augmentation de la concentration d'iNOS et une diminution de celle d'eNOS ont été observées durant l'obésité et il y aurait donc une altération au niveau de la production de NO. De plus, ce NO produit serait responsable de stress nitrosatifs. Le L-NIL permettrait donc de réduire ce NO délétère. Le but de cette étude consiste dès lors à mettre en évidence l'implication du NO dans le trouble du métabolisme, du développement de la résistance à l'insuline et de l'inflammation associée à l'obésité au niveau du tissu adipeux et du foie. Nos résultats ont démontrés qu'une alimentation riche en sucres et en graisses ainsi qu'une sédentarité induisent des dysfonctionnements du métabolisme et mènent progressivement à de l'obésité. En effet, une augmentation de l'ingestion de lipides mène à une augmentation de leur stockage sous forme de triglycérides par le tissu adipeux. Deux conséquences suivent ce phénomène : Premièrement, l'augmentation de la taille des adipocytes et donc leur impossibilité à stocker d'avantage d'acides gras. Il en résulte une accumulation ectopique au niveau de différents organes. Deuxièmement, en tant qu'organe endocrine, le tissu adipeux augmente la sécrétion d'adipokines, ce qui va mener à de l'inflammation, des stress oxydatifs et de la résistance à l'insuline. Ceci mène au développement de lésions au niveau d'autres organes comme le foie, les muscles, le cœur ou les reins. Dans ce contexte physiopathologique particulier, nous nous sommes attachés à caractériser les atteintes adipocytaires et hépatiques grâce à l'analyse histologique et fonctionnelle de ces organes. Par ailleurs, le développement de l'obésité peut mener à différentes perturbations liées à la dyslipidémie, l'inflammation, au stress oxydatif ou à la résistance à l'insuline. Les tissus et le plasma de souris appartenant aux groupes LFD et HFD, traitées ou non à l'aide de L-NIL, ont également été analysés et les résultats obtenus ont révélés un effet bénéfique du L-NIL.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

**Promoteur:** Nathalie Caron



---

## Remerciements

---

Tout d'abord, je tiens à dire que ce mémoire n'a pas été un simple travail scientifique, il a été pour moi une aventure, autant sur le plan social que sur le plan intellectuel. J'ai appris à mettre en pratique la théorie acquise au cours des années précédentes et à me familiariser avec les techniques qui me seront nécessaires pour continuer ma carrière. Cela n'aurait pas été possible sans le soutien, la gentillesse et la bonne humeur des personnes qui m'ont entourées et encadrées.

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice Nathalie Caron de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je la remercie pour sa sympathie et pour son aide à la rédaction de ce mémoire.

Merci également à messieurs Arnould et Demine ainsi qu'à mesdames Dogné et Ben Aneur d'avoir pris le temps de lire ce mémoire et de l'avoir évalué.

Merci à Anne-Emilie, mon encadrante pour ses conseils et son professionnalisme. Tu m'as appris à pouvoir être autonome tout en travaillant en équipe. Merci aussi pour ta sympathie et ton écoute.

Je remercie également toutes les filles du laboratoire de physiologie générale. Vanessa, merci d'avoir été si présente, tu étais là pour effacer mes doutes et mes angoisses. Tu m'as appris beaucoup d'un point de vue scientifique mais également cinématographique. Isabelle, merci pour ton aide au sein du laboratoire. C'est un vrai plaisir de travailler avec une personne comme toi. J'ai tout particulièrement apprécié ton humour et ta sympathie. Inès, merci pour ton aide durant cette année. Dès mon arrivée, tu es celle qui m'a appris la plupart des manips. Merci pour ta patience et ton professionnalisme. Blanche, dès ton arrivée au labo, le courant est directement passé car il est facile de parler avec toi de tout et de rien. Ta bonne humeur constante ainsi que tes conseils pendant mes moments de doutes m'ont beaucoup aidé. Virginie, j'apprécie beaucoup ton calme et ta patience ainsi que ta disponibilité à chaque fois que j'avais besoin de ton aide. Enfin, Lucie, merci pour ta bonne humeur contagieuse au sein du labo.

Evidemment, cette année n'aurait pas été pareil sans tous les bios avec qui j'ai passé des moments inoubliables. En particulier la meilleure, la plus gentille la plus cool de toutes les personnes que j'ai rencontrée à l'Unamur, je cite Delphine Depierreux (merci d'avoir écrit tes propres remerciements même si je n'en pense pas moins), mais également Dimitri et Damien. Ces 5 années avec vous sont passées beaucoup trop vite mais ne marquent certainement pas la fin de notre amitié. Ces 2 dernières années de master m'ont permis de faire de nouvelles rencontres dont Céline et Nadège avec qui j'ai passé de super moments. Non Nadège, je ne t'ai pas oubliée !! Cette année de mémoire n'aurait pas du tout été pareille sans toi. Même si l'on ne se connaissait pas très bien au début, j'ai très vite appris à comprendre tes phrases sans aucun sens et j'ai pu compter sur toi en cas de doute durant toute cette année.

Finalement, je tiens à remercier ma famille. Ma mère, Jean-Louis, Rafael et Stéphanie qui m'ont écouté et soutenue pendant ces 5 années. Je tiens également à remercier Pierre qui est toujours présent et de bons conseils. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ce mémoire.

---

## Liste des abréviations

---

µg	Microgramme
µl	Microlitre
A	Ampère
AACE	American association of clinical endocrinologists
AB	Antibody
Abs	Absorbance
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACOD	Acyl-CoA oxidase
ACS	Acyl-CoA synthetase
Acyl-CoA	Acyl-Coenzyme A
ADA	American association of diabete
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine di-phosphate
AGL	Acides gras libres
AKT (=PKB)	Protein kinase B
ANOVA	Analysis of variance
ApoB	Apolipoprotéine B
APS	Persulfate d'ammonium
ARNase	Ribonucléase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine tri-phosphate
CD36	Cluster of differenciation 36
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1
Cyt C	Cytochrome C
CVD	Cardiovascular disease
DAB	Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycérol
dl	Décilitre
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothélial Nitric Oxyde Synthase
FABP	Fatty acid binding protein
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide
FAS	Fatty acid synthase
FATP	Fatty acid transport proteins
FoxO1	Forkhead box protein O1
FxR	Farnesoid X receptor
G6P	Glucose 6 phosphate
G6Pase	Glucose 6 phosphatase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase

GK	Glycérokinase
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GLUT	Glucose transporter
GPO	Glycerol-3-phosphate oxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogène peroxyde
h	Heure
HCl	Chlorure d'hydrogène
HDL	High-density lipoprotein
HFD	High-Fat Diet
Hg	Mercure
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HRP	Horseradish peroxidase
HSL	Hormone sensitive lipase
IHC	Immunohistochimie
IκKB	I kappa B kinase
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Inductible Nitric Oxyde Synthase
IRS	Insulin receptor substrat
Jnk1	C-jun-N-terminal kinase 1
Kg	Kilogramme
KO	Knock out
L	Litre
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
L-NIL	L-N6-(1-iminoéthyl)-lysine
LDL	Low-density lipoprotein
LFD	Low-Fat Diet
LPL	Lipoprotéine lipase
LxRα	Liver X receptor α
m	Mètre
M	Mole
mAB	Anticorps monoclonal
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocytes Chemoattractant Protein-1
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEHA	3-methyl-N-ethyl-N-aniline
mg	Milligramme
ml	Millilitre
MLV	Murine Leucemia Virus
mm	Millimètre
mm <sup>2</sup>	Millimètre carré
MO	Macrophage
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NaCl	Chlorure de Sodium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NCEP	National cholesterol education program



NEFA	Non-Esterified Fatty Acid
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
nm	Nanomètre
nNOS	Neural Nitric Oxyde Synthase
NO	Nitric Oxyde
NOS	Nitric Oxyde Synthase
NS	Non significatif
O <sub>2</sub>	Oxygène
OCT	Optimal cutting temperature
OMS	Organisation mondiale de la santé
pAB	Anticorps polyclonal
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxikinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinases
PKC	Protéine kinase C
pO <sub>2</sub>	Pression partielle en oxygène
POD	Peroxidase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PVDF	Polyvinylidène fluorure
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RE	Reticulum endoplasmique
RI	Résistance à l'insuline
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCD	Stéoyl-CoA desaturase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Erreur standard à la moyenne
SIN-1	3-(4-morpholiny) sydnonimine
SRA	Système Rénine-Angiotensine
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
STD	Standard
T2D	Diabète de type 2
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TG	Triglycérides
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
V	Volt
VLDL	Very low-density lipoprotein

WHO

World Health Organization

## Table des matières

### INTRODUCTION

<b>1. Avant-propos .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Le syndrome métabolique .....</b>	<b>1</b>
<b>3. L'obésité.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Tissus touchés par l'obésité.....</b>	<b>5</b>
4.1 Le tissu adipeux .....	5
4.1.1 Fonctionnement du tissu adipeux chez les individus sains .....	5
4.1.2 Fonctionnement du tissu adipeux chez les individus obèses.....	6
4.1.3 L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau du tissu adipeux .....	7
4.2 Le foie.....	8
4.2.1 Fonctionnement du foie chez les individus sains .....	8
4.2.2 Fonctionnement du foie chez les individus obèses .....	9
4.2.3 L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau du foie	11
4.3 Les muscles.....	11
4.3.1 Fonctionnement du muscle chez les individus sains.....	11
4.3.2 Fonctionnement du muscle chez les individus obèses .....	12
4.3.3 L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau des muscles .....	13
<b>5. La résistance à l'insuline .....</b>	<b>13</b>
5.1 L'insuline.....	13
5.2 Lien entre obésité et résistance à l'insuline .....	14
5.3 La double action de l'insuline dans le foie .....	16
<b>6. Le monoxyde d'azote .....</b>	<b>17</b>
<b>7. Objectifs du mémoire .....</b>	<b>20</b>

### MATERIEL ET METHODES

<b>1. Groupes expérimentaux .....</b>	<b>21</b>
<b>2. Cages métaboliques.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Echantillons biologiques.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Approches analytiques.....</b>	<b>23</b>



4.1	Dosage de l'insuline .....	23
4.2	Dosage des triglycérides .....	23
4.3	Méthode d'homogénéisation en trois phases .....	23
4.3.1	Dosage des triglycérides.....	24
4.3.2	Dosage des acides gras non-estérifiés (NEFA) .....	24
4.4	Dosage du monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) .....	25
<b>5.</b>	<b>Analyses morphologiques .....</b>	<b>25</b>
5.1	Coloration hématoxyline et éosine .....	25
5.2	Coloration oil red O .....	26
5.3	Immunohistochimie .....	26
5.3.1	Pré-traitement .....	26
5.3.2	Immunohistochimie.....	27
<b>6.</b>	<b>PCR quantitative en temps réel (qPCR) .....</b>	<b>27</b>
6.1	Extraction de l'ARN .....	27
6.2	Transcription inverse .....	28
6.3	qPCR (real time PCR) .....	29
<b>7.</b>	<b>Western blot .....</b>	<b>29</b>
7.1	Dosage protéique .....	29
7.2	Préparation des gels .....	29
7.3	Préparation des échantillons .....	30
7.4	Migration des échantillons.....	30
7.5	Transfert.....	30
7.6	Blocage .....	30
7.7	Anticorps .....	31
7.8	Révélation .....	31
<b>8.</b>	<b>Analyses statistiques .....</b>	<b>31</b>

<h2 style="text-align: center;">RESULTATS</h2>
--

<b>1.</b>	<b>Variations du poids corporel, du poids du foie et des quantités d'eau et de nourriture ingérées chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL ainsi que les effets sur la dyslipidémie .....</b>	<b>32</b>
1.1	Effets d'un régime HFD sur les données métaboliques .....	32
1.2	Effets d'un régime HFD sur les marqueurs sanguins .....	33
<b>2.</b>	<b>Caractérisation histologique et fonctionnelle des principaux organes cibles de l'obésité.....</b>	<b>34</b>



2.1	Caractérisations histologiques et adaptation fonctionnelle du tissu adipeux.....	34
2.2	Caractérisations histologiques et adaptation fonctionnelle du foie .....	35
<b>3.</b>	<b>Conséquences de l'obésité : inflammation, résistance à l'insuline et stress oxydatifs ..</b>	<b>38</b>
3.1	Effets d'un régime HFD sur l'inflammation du tissu adipeux et du foie .....	38
3.2	Effets d'un régime HFD sur la résistance à l'insuline .....	41
3.3	Effets d'un régime HFD sur le stress oxydatif/nitrosatif.....	44
<b>4.</b>	<b>Etude de l'enzyme eNOS durant l'obésité .....</b>	<b>47</b>

## DISCUSSION

<b>1.</b>	<b>Atteintes systémiques suite à un régime riche en graisse (HFD) chez la souris C57BL/6</b>	<b>49</b>
<b>2.</b>	<b>Atteintes des adipocytes suite à un régime riche en graisse chez la souris C57BL/6</b>	<b>51</b>
<b>3.</b>	<b>Atteintes des hépatocytes suite à un régime riche en graisse chez la souris C57BL/6..</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>Métabolisme du NO durant l'obésité et effet du L-NIL .....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>58</b>

## BIBLIOGRAPHIE

# INTRODUCTION



### 1. Avant-propos

---

De nos jours, le syndrome métabolique est un problème majeur de santé publique, principalement dans les sociétés industrialisées. Ce syndrome regroupe un ensemble de symptômes tels qu'une résistance à l'insuline, de l'hypertension ou des troubles du métabolisme des lipides menant à l'obésité. Une alimentation déséquilibrée ainsi qu'une sédentarité induisent des dysfonctionnements du tissu adipeux, résultant en un trouble de la sécrétion des adipokines, molécules régulatrices produites par les adipocytes. Ces processus déterminent le développement de lésions au niveau d'autres organes comme le foie, les muscles, le cœur ou les reins. Dans ce contexte physiopathologique particulier, l'une des approches expérimentales mises en œuvre dans le laboratoire de Physiologie générale visait à mettre en évidence des altérations structurelles et fonctionnelles au niveau du rein et d'évaluer l'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la progression des atteintes rénales (Depommier, Master BBMC 2013-2014, UNamur).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes attachés à caractériser les atteintes adipocytaires, hépatiques et musculaires dans notre modèle expérimental chez la souris. En effet, le développement de l'obésité s'accompagne d'une réponse inflammatoire, qui pourrait être à l'origine de la résistance à l'insuline (Tsuchiya *et al.*, 2007 ; Luca et Olefsky, 2008). Il y aurait également une altération au niveau de la production de NO puisqu'une augmentation de iNOS et une diminution de eNOS ont été observée. De plus, ce NO produit serait responsable de stress nitrosatifs. Le but de cette étude consiste dès lors à mettre en évidence l'implication du NO dans le développement de la résistance à l'insuline et de l'inflammation associée à l'obésité au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles.

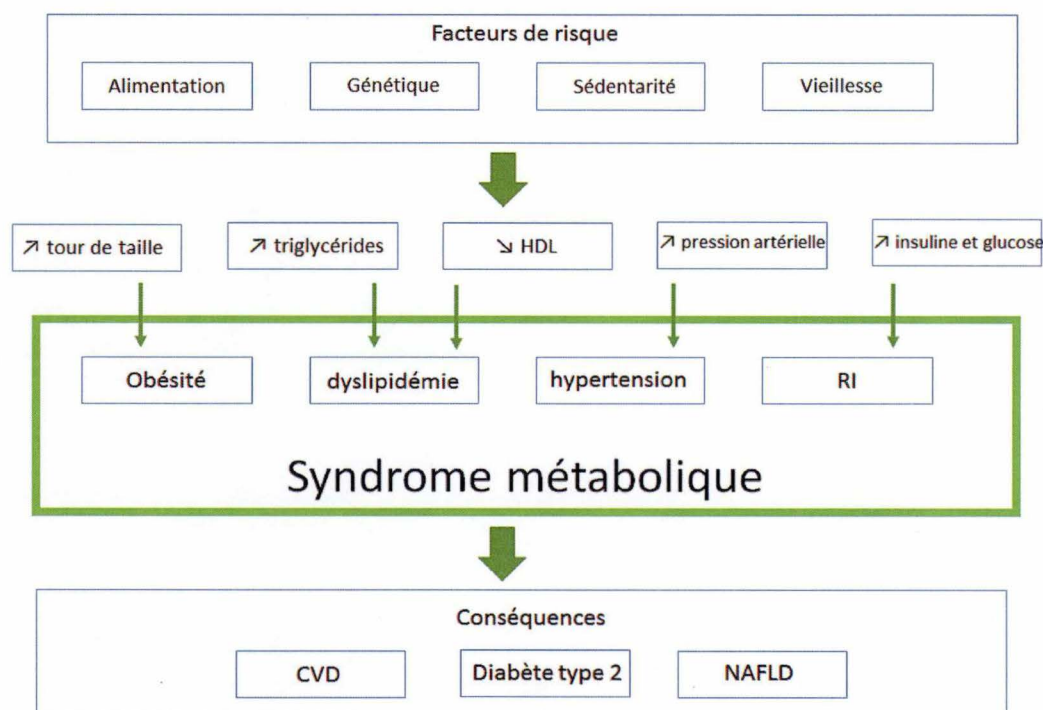
### 2. Le syndrome métabolique

---

Le syndrome métabolique est un trouble endocrinien complexe et multifactoriel. Il est la conséquence d'une sédentarité, du vieillissement, de dysfonctionnements endocriniens, d'aberrations génétiques ou d'une alimentation riche en lipides (Kumar *et al.*, 2013). Dans la plupart des cas, les patients présentant ce syndrome sont atteints conjointement d'obésité, d'insulino-résistance, d'hypertension, d'intolérance au glucose, d'hyperinsulinémie, et présentent une élévation du niveau de triglycérides (TG) et des concentrations basses en « High Density Lipoprotein » (HDL). Toutes ces anomalies peuvent mener à des maladies cardiovasculaires (CVD), au diabète de type 2 (T2D) ou à une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (**Figure 1**) (Altunkaynak, 2005; Greenberg et Obin, 2006, Bruce et Byrne, 2009 ; Kumar *et al.*, 2013).

Ce syndrome fut décrit pour la première fois par Raeven en 1988 (Raeven, 1988 cité dans Kumar *et al.*, 2013). A l'heure actuelle, plusieurs définitions existent et il est ainsi difficile de déterminer avec exactitude à quel moment un individu souffre de ce syndrome ou non (Table 1). Parmi ces différentes définitions, 4 caractéristiques principales sont retenues : hyperglycémie – hypertension – dyslipidémie – obésité.

INTRODUCTION



**Figure 1** : Schéma représentant les facteurs de risque pouvant conduire au développement du syndrome métabolique ainsi que ses conséquences potentielles. RI= résistance à l’insuline ; CVD = maladies cardiovasculaires ; NAFLD = stéatose hépatique non-alcoolique.

**Table 1** : Définitions du syndrome métabolique

ADA-1998	OMS-1998	NCEP-2001	AACE-2002
Intolérance au glucose	Glucose plasmatique à jeun : 110-125 mg/dl	T2D, intolérance au glucose ou résistance à l’insuline	Glucose plasmatique à jeun : 110-125 mg/dl ou > 140 mg/dl 2 heures après ingestion de glucose
Obésité	Circonférence de la taille >40 (homme) et > 35 (femme)	IMC > 30, ratio taille/hanche > 0,90 (homme) et > 0,85 (femme)	IMC > 25 ou circonférence de la taille >40 (homme) et > 35 (femme)
Dyslipidémie (haut niveau TG, bas niveau HDL)	TG>150 mg/dl, HDL < 40 (homme), < 50 (femme)	TG>150 mg/dl, HDL < 35 (homme), < 39 (femme)	TG>150 mg/dl, HDL < 40 (homme), < 50 (femme)
Hypertension	Pression sanguine > 130/85 mm Hg	Hypertension Pression sanguine > 160/90 mm Hg Microalbuminurie > 20 µg/min	Pression sanguine > 130/85 mm Hg

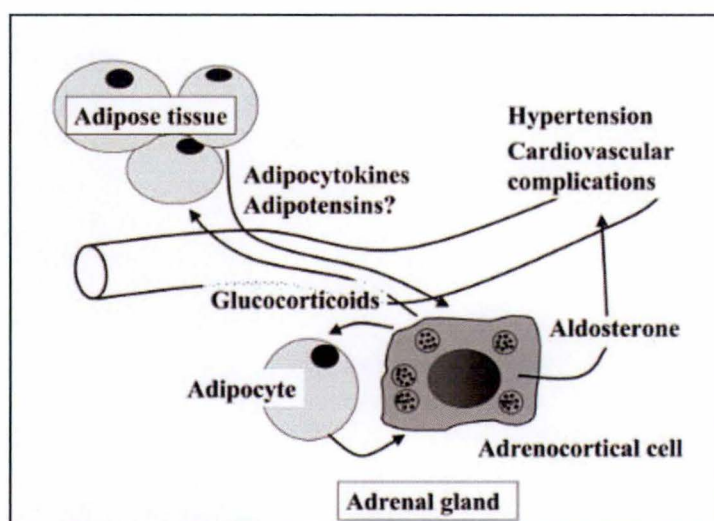
Les différentes définitions du syndrome métabolique selon l’association américaine du diabète (American Association of Diabetes - ADA), l’organisation mondiale de la santé (OMS), le programme d’éducation nationale du cholestérol (National Cholesterol Education Program - NCEP) et l’association américaine des endocrinologues cliniques (American Association of Clinical Endocrinologists – AACE).  
Abréviations : IMC : Indice de masse corporelle ; TG : triglycérides ; T2D : diabète de type 2 (Adapté de Kumar *et al.*, 2013).



L'hyperglycémie peut résulter d'une intolérance au glucose ou d'une résistance à l'insuline. L'intolérance au glucose survient lorsque la concentration plasmatique de glucose est trop élevée à jeun et reste encore élevée longtemps après ingestion de glucides. La résistance à l'insuline provient du fait que les différents tissus-cibles ne répondent plus à cette hormone, dont la sécrétion par le pancréas permet, en conditions physiologiques, l'utilisation optimale du glucose. Il en résulte ainsi une élévation de la concentration plasmatique du glucose (hyperglycémie) ainsi que de l'insuline (hyperinsulinémie) pouvant conduire au développement du diabète de type 2 (Magnan, 2006).

La dyslipidémie est caractérisée quant à elle par une augmentation des acides gras libres (AGL), des TG, des apolipoprotéines B (Apo B), et des « Very Low Density Lipoprotein » (VLDL) dans le sang. Par contre, le niveau de HDL est nettement diminué chez les personnes atteintes de ce syndrome (Grundy, 2004). Etant donné que les acides gras jouent un rôle dans différents processus parmi lesquels on peut citer la synthèse des membranes cellulaires et le stockage d'énergie, et qu'ils sont également impliqués dans des voies de signalisation intracellulaires, il est évident qu'une dyslipidémie entraîne des troubles du fonctionnement cellulaire (Berlanga *et al.*, 2014). Il est également à noter que les VLDL sont responsables du transport des TG, du cholestérol et du cholestéryl ester à partir du foie vers les tissus périphériques (Nelson et Cox, 2008). L'accumulation de TG peut découler d'une alimentation riche en acides gras (AG) ou en hydrates de carbone mais provient également d'une augmentation de la synthèse endogène de lipides et donc d'une augmentation de leur stockage sous forme de TG. Lorsque la concentration en lipide est trop élevée, on parle de lipotoxicité car ces lipides occasionnent des dommages cellulaires et tissulaires.

L'hypertension est causée en partie par une augmentation du niveau de sécrétion d'adipokines chez l'individu obèse. Ces hormones sont sécrétées par le tissu adipeux proportionnellement à sa masse globale. En cas d'obésité, les adipocytes augmentent de taille et sécrètent donc une quantité plus importante d'adipokines. Certaines d'entre-elles, comme la leptine ou la résistine, agissent sur les vaisseaux sanguins et permettent d'augmenter la pression sanguine (Yiannikouris *et al.*, 2010). Cependant, les adipokines ne sont pas la seule cause d'hypertension lors de syndrome métabolique. En effet, chez les personnes atteintes de ce syndrome, le degré d'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est augmenté étant donné que le tissu adipeux sécrète le « mineralocorticoid-releasing factor », qui stimule les cellules du cortex surrénalien à produire de l'aldostérone et des glucocorticoïdes. L'aldostérone participe au développement de l'hypertension et des complications cardiovasculaires liées à l'obésité, tandis que les glucocorticoïdes stimulent la croissance et la prolifération des adipocytes (**Figure 2**) (Schraven *et al.*, 2003).



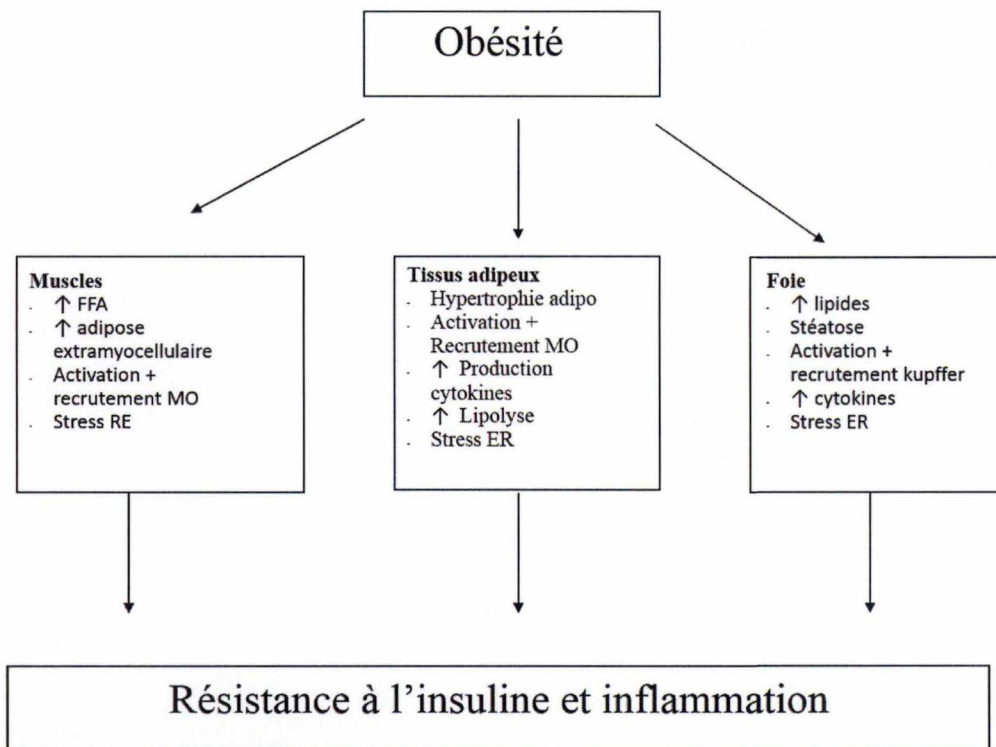
**Figure 2 :** Libération de « mineralocorticoid-releasing factors » stimulant la stéroïdogénèse adrenocorticale avec un effet sur la sécrétion minéralocorticoïde. Augmenter ainsi la sécrétion d'aldostérone pourrait être un facteur menant à l'hypertension et donc aux maladies cardiovasculaires. Les glucocorticoïdes stimulent la croissance des adipocytes et leur prolifération. Les flèches indiquent une stimulation. (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2003)

### 3. L'obésité

Actuellement, l'obésité peut être considérée comme une épidémie en termes de santé publique, étant donné que la prévalence a triplé depuis 1970 (Eilerman *et al.*, 2014). Pour être considéré comme obèse, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que l'indice de masse corporelle (IMC) d'un individu doit être supérieur à  $30 \text{ kg/m}^2$ , alors qu'un IMC se situant entre  $25$  et  $30 \text{ kg/m}^2$  détermine un surpoids (World Health Organization, 2014). L'obésité touche toutes les classes d'âge, aussi bien les hommes que les femmes. En effet, en 2008, 1,4 milliards d'adultes étaient en surpoids et 500 millions étaient considérés comme obèses (Eilerman *et al.*, 2014). En 2010, 32% des enfants et adolescents américains âgés de 2 à 19 ans affichaient un surpoids et 17% d'entre eux étaient obèses. Depuis, la prévalence de l'obésité est toujours élevée mais reste stable (Lohrmann *et al.*, 2014 ; Ogden *et al.*, 2014).

L'obésité est une maladie métabolique caractérisée par une accumulation excessive et anormale de lipides. Lorsque le tissu adipeux ne peut plus les stocker, il en résulte une accumulation de graisse ectopique dans différents organes comme le foie, les muscles ou les reins, conduisant à des altérations morphologiques et fonctionnelles de ces tissus. Cette pathologie est la conséquence d'un mode de vie sédentaire et d'une alimentation riche en acides gras. Il y a donc un excès d'apport calorique qui n'est pas dépensé par l'organisme menant à des troubles du métabolisme des lipides et du glucose (**Figure 3**) (Chudek *et al.*, 2006 ; Adamczak *et al.*, 2013).





**Figure 3** : Les atteintes musculaires, adipocytaires et hépatiques menant à la résistance à l'insuline et à l'inflammation durant l'obésité.

## 4. Tissus touchés par l'obésité

### 4.1 Le tissu adipeux

Le premier organe subissant les conséquences de l'obésité est le tissu adipeux. D'un point de vue histologique, les adipocytes sont de 2 types : uniloculaires (formant la graisse blanche) et multiloculaires (formant la graisse brune). Dans le cas de l'obésité, la graisse blanche est plus particulièrement atteinte (Stevens et Lowe, 1997).

#### 4.1.1 *Fonctionnement du tissu adipeux chez les individus sains*

En conditions physiologiques, les adipocytes exercent deux rôles principaux, à savoir le stockage des lipides sous forme de TG et la sécrétion d'hormones, appelées adipo(cyto)kines. Le stockage des TG se fait après l'ingestion de nourriture (état posprandial), tandis que les acides gras sont libérés pendant la période de jeûne pour assurer le maintien de la production d'énergie. Après une prise alimentaire, les lipides de l'intestin se retrouvent dans les chylomicrons sous forme de TG. La lipoprotéine lipase (LPL) plasmatique permet l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons (mais également contenues dans les VLDL) en vue d'obtenir des acides gras qui seront ensuite réestérifiés en TG dans les adipocytes pour être stockés. L'hydrolyse des TG en acides gras et glycérol au niveau du tissu adipeux se fait grâce à la lipase hormono-sensible (HSL). Il est important de noter que ces deux enzymes sont

principalement régulées par l'insuline puisque elle permet d'inhiber la HSL mais exerce une action activatrice sur la LPL. La conséquence de l'action de l'insuline est donc une augmentation de la quantité d'acides gras captés par les adipocytes en vue de les stocker sous forme de TG. De plus, l'insuline aura pour conséquence de diminuer la quantité d'acides gras plasmatiques obtenus grâce à la lipolyse puisqu'elle possède une action inhibitrice sur la HSL (**Figure 4**) (Hajer *et al.*, 2008 ; Nelson et Cox, 2008).

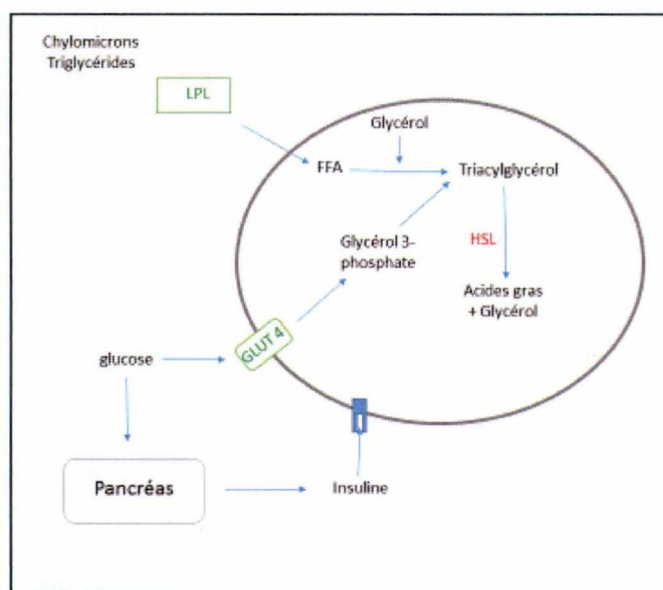
Ayant également une fonction endocrine, les adipocytes sécrètent des adipokines impliquées dans le métabolisme du glucose, des lipides, dans l'inflammation, la coagulation, la régulation de la pression sanguine mais aussi dans le comportement alimentaire puisque la leptine permet de contrôler la satiété (Chudek *et al.*, 2006 ; Adamczak *et al.*, 2013). Parmi ces adipokines, nous retrouvons principalement l'adiponectine ou la leptine mais également des molécules inflammatoires comme IL-6 (interleukine-6) ou MCP-1 (monocyte chemo-attractant 1) (Gerner *et al.*, 2013, Khan *et al.*, 2014).

### *4.1.2 Fonctionnement du tissu adipeux chez les individus obèses*

Chez les personnes souffrant d'obésité, une augmentation de la lipolyse a été observée. En effet, la résistance à l'insuline est une conséquence de l'obésité et l'hormone n'exerce donc plus sa fonction inhibitrice sur l'enzyme HSL permettant la lipolyse. Ceci mène à une augmentation du niveau plasmatique d'AGL indépendamment du statut nutritionnel (Chudek *et al.*, 2006 ; Adamczak *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la libération d'adipokines dans le sang par les adipocytes est proportionnelle à leur taille, qui augmente en cas d'obésité. Il en résulte une sécrétion plus élevée d'adipokines (leptine, TNF- $\alpha$ , MCP-1, ...). Seule l'adiponectine affiche une concentration plasmatique faible. Cette adipokine présente des effets anti-athérosclérotiques, améliore la sensibilité à l'insuline et permet la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie et les muscles. En plus d'améliorer l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie, elle aurait des propriétés anti-inflammatoires. La diminution du taux circulant d'adiponectine proviendrait entre autres de la diminution d'un facteur de transcription impliqué dans la stimulation de la production de cette adipokine : PPAR- $\gamma$ . Ce facteur de transcription active également des gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes, les protéines de transport des acides gras, la LPL ainsi que l'acyl-CoA synthase (Hajer *et al.*, 2008, Kloting et Blüher, 2014).

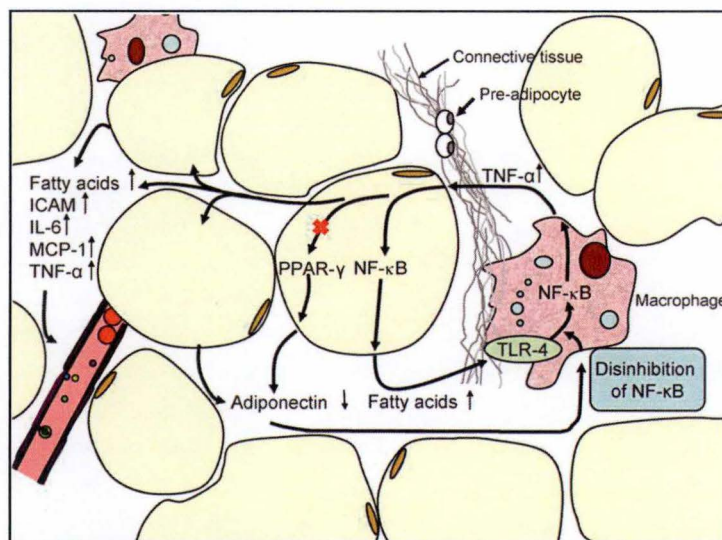




**Figure 4 :** Effet de l'insuline sur les enzymes des adipocytes. La lipoprotéine lipase (LPL) permet l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons. Le transporteur GLUT4 permet l'entrée du glucose dans la cellule. L'hormone sensitive lipase (HSL) permet la dégradation du TG en acides gras et glycérol afin de les relacher dans le sang. L'insuline stimule les enzymes représentées en vert et inhibe celle en rouge.

#### 4.1.3 L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau du tissu adipeux

Les événements menant à l'initiation de l'inflammation dans l'obésité sont actuellement peu connus. Etant donné que la surnutrition mène à l'hypertrophie et l'hyperplasie du tissu adipeux, il est probable que l'inflammation résulte d'une hypoxie au niveau des adipocytes induisant une activation des voies de stress cellulaire. Ceci causerait l'inflammation et la libération de cytokines et d'autres signaux pro-inflammatoires (Shoelson *et al.*, 2006 ; Luca et Olefsky, 2009, Ye *et al.*, 2009). Les adipocytes de plus grande taille libèrent plus d'acides gras libres et ceux-ci peuvent se lier au TLR-4 des macrophages. Il en résulte une stimulation de la voie du NFκB et donc une augmentation de la production du TNF-α ce qui stimule les adipocytes à effectuer la lipolyse et à augmenter l'expression d'une variété de gènes dont celui codant pour le MCP-1. Son rôle est de recruter les macrophages au niveau du tissu adipeux (Hajer *et al.*, 2008) (**Figure 5**). Il existe une différence entre les macrophages résidents de type M2 anti-inflammatoires (sécrétant IL-10 et cytokines anti-inflammatoires) et les macrophages recrutés de type M1 pro-inflammatoires (sécrétant TNF-α et IL-6.). Ce sont ces derniers qui s'accumulent au fur et à mesure de la prise de poids. Chez des individus sains, on retrouve 10% de macrophages dans le tissu adipeux alors que les individus obèses affichent un pourcentage de macrophage de 50% (Luca et Olefsky, 2009). Le faible niveau d'adiponectine a pour effet de renforcer l'inflammation puisque cette adipokine inhibe la voie de NFκB (Hajer *et al.*, 2008).



**Figure 5 :** Inflammation au niveau du tissu adipeux en cas d'obésité. Les adipocytes libèrent des acides gras libres et ceux-ci peuvent se lier au TLR-4 des macrophages. Il en résulte une activation de la voie du NFκB et donc une augmentation de la production du TNF-α, ce qui stimule les adipocytes à effectuer la lipolyse et à augmenter l'expression d'une variété de gènes dont celui codant pour le « monocyte chemo attractant protein-1 » (MCP-1). La production réduite d'adiponectine permet de renforcer l'inflammation puisque cette adipokine inhibe la voie de NFκB. Ce faible niveau proviendrait d'une diminution du facteur de transcription PPAR-γ (Hajer *et al.*, 2008)

## 4.2 Le foie

De par le rôle majeur qu'il joue dans le métabolisme du glucose et des lipides, le foie est un organe particulièrement touché par l'obésité. L'hépatocyte, qui présente 3 faces importantes - sinusoïdale, biliaire et intercellulaire-, intervient dans le transfert de substances entre les vaisseaux sanguins, les canalicules biliaires et la cellule. Les faces sinusoïdales représentent 70% de la surface de l'hépatocyte car les échanges avec le sang sont nombreux (Stevens et Lowe, 1997).

### 4.2.1 *Fonctionnement du foie chez les individus sains*

Chez les sujets sains, cet organe a pour rôle d'importer les acides gras, de les synthétiser, de les stocker, de les utiliser pour en faire de l'énergie mais également de les exporter. En effet, l'importation des acides gras ingérés se fait par les capillaires mais peut se faire aussi directement de l'intestin au foie par la veine porte. Les principaux transporteurs d'acides gras sont les protéines de transports des acides gras (FATP), les cavéolines, les translocases (FAT/CD36) et les protéines liant les acides gras (FABP) (Ge *et al.*, 2010). Sans ces transporteurs, il ne peut y avoir d'accumulation d'acides gras dans le foie. En effet, des souris knock-out (KO) pour la FATP affichent une résistance à l'obésité induite par la nourriture et ne montrent pas d'accumulation de TG hépatiques (Doege *et al.*, 2006). Les FABP se lient avec une haute affinité aux ligands hydrophobes comme les longues chaînes d'acides gras et transportent ceux-ci dans des compartiments cellulaires spécifiques : la mitochondrie et le peroxysome pour l'oxydation, le RE pour la réestérification, les gouttelettes lipidiques pour le stockage ou le noyau pour la régulation de l'expression de gènes (Zimmerman *et al.*, 2002 cité dans Berlanga *et al.*, 2014). Le foie possède aussi un rôle de synthèse des lipides à partir



d'acides gras libres et de stockage sous forme de TG. Une autre fonction majeure du foie est l'oxydation des acides gras au niveau de la mitochondrie, du reticulum endoplasmique ou du peroxysome. Les acides gras sont dégradés en acétyl-CoA, permettant de fournir de l'énergie. Après un repas, la  $\beta$ -oxydation est inhibée tandis que la lipogenèse est favorisée permettant le stockage et la distribution des lipides. Finalement, le rôle d'exportation de cet organe est assuré grâce aux VLDL qui permettent la sécrétion des TG dans le sang (Postic et Girard, 2008). Ces VLDL sont des lipoprotéines produites par le foie et sécrétées dans la circulation. Leur rôle est d'amener les TG dans les tissus périphériques, en particulier le tissu adipeux.

Le foie a également un rôle important dans le métabolisme du glucose. Le transporteur de glucose GLUT 2 est tellement efficace que la concentration en glucose hépatique est sensiblement la même que celle du glucose plasmatique. Une fois dans la cellule, le glucose peut être phosphorylé en glucose 6-phosphate (G6P). En fonction des besoins métaboliques, ce G6P pourra être utilisé de différentes façons :

- L'excès de G6P est déphosphorylé et atteint les vaisseaux sanguins pour fournir de l'énergie aux muscles et au cerveau ;
- Le G6P peut être transformé en pyruvate via la glycolyse, puis en acétyl-CoA pour ensuite subir le cycle de Krebs et finalement la phosphorylation oxydative, en vue de produire de l'ATP lorsque l'organisme a besoin d'énergie ;
- L'acétyl-CoA précédemment cité peut également être utilisé comme précurseur d'acides gras ;
- Le cycle des pentoses phosphate peut également être réalisé en vue de former du NADPH qui est un cofacteur essentiel dans la formation des acides gras, du cholestérol et du D-ribose 5 phosphate mais également dans la détoxification et l'élimination des médicaments et xénobiotiques ;
- Lorsqu'il y a un excès de glucose, la synthèse de glycogène se fait au niveau du foie et en condition de jeûne, le glucose est libéré.

### 4.2.2 Fonctionnement du foie chez les individus obèses

Chez le sujet obèse, les métabolismes du glucose et des lipides sont perturbés. Tout d'abord, la concentration plasmatique d'acides gras augmente, ce qui mène donc à une amélioration de la capacité des hépatocytes à capter les acides gras et à les stocker sous forme de TG. Cette augmentation de stockage en lipides peut mener à des NAFLD. Ceci proviendrait d'une élévation de la synthèse du facteur de transcription PPAR- $\gamma$  qui agit sur différentes enzymes permettant le stockage des lipides dans le foie (Westerbacka *et al.*, 2007).

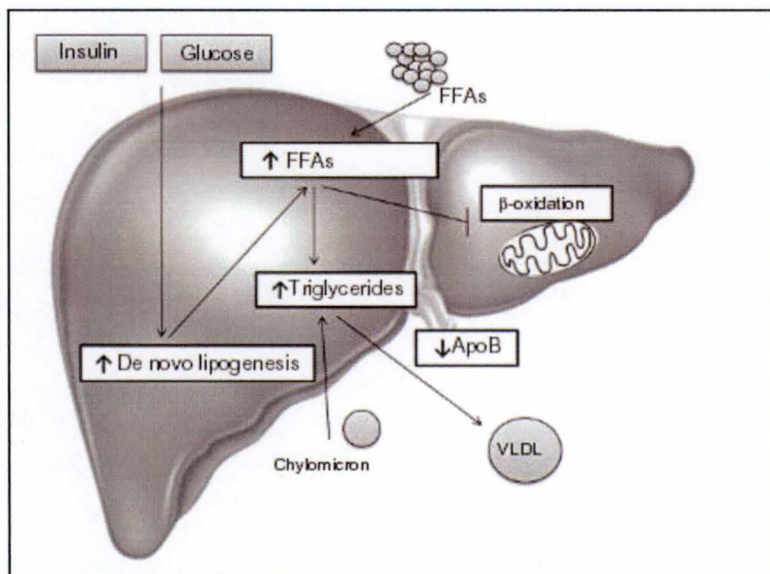
En outre, différentes études ont montré que le nombre et l'activité des protéines de transport des acides gras localisées sur la membrane des hépatocytes augmentent. En effet, les FATP, les cavéolines, les translocases et les protéines liant les FABP sont beaucoup plus exprimées au niveau de la membrane des hépatocytes chez les individus obèses (Ge *et al.*, 2010). En plus de l'augmentation de la quantité d'acides gras captés par le foie, il se produit une augmentation de la lipogenèse *de novo* au sein de cet organe. Ceci est la conséquence de l'activité de certains facteurs de transcription tel que le « liver X receptor  $\alpha$  » (LXR $\alpha$ ), le « sterol regulatory element-binding protein 1c » (SREBP1c), le « carbohydrate-responsive element-binding protein » (ChREBP) et le « farnesoid X receptor » (FXR). Certains de ces facteurs permettent une augmentation de la transcription d'enzymes impliquées dans la synthèse de lipides telles que l'acétyl coA carboxylase (ACC), la « fatty acid synthase » (FAS) ou le « steoyl CoA desaturase



1 » (SCD 1). Le LxR est augmenté et permet une stimulation de l'activité de SREBP1c, d'ACC1, de FAS et de SCD1 impliquées dans la lipogenèse. Concernant le SREBP1c, il s'agit de l'isoforme la plus représentée au niveau du foie, qui permet l'activation de gènes impliqués dans la lipogenèse ainsi que de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol. Sa transcription est induite par l'insuline (Berlanga *et al.*, 2014).

Un autre phénomène survenant durant l'obésité est la diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras en vue de les dégrader afin de produire de l'énergie. Cette diminution est la conséquence d'une diminution de l'expression du facteur de transcription PPAR- $\alpha$  qui permet l'expression de gènes nécessaires pour la  $\beta$ -oxydation. En effet, des souris KO pour ce gène ne peuvent recourir à l'oxydation des acides gras et développent donc des stéatoses sévères (Harano *et al.*, 2006). En plus de l'implication de PPAR- $\alpha$ , la CPT1 joue également un rôle dans la diminution de l'oxydation des acides gras puisqu'elle est inhibée par le malonyl-CoA.

Enfin, il se produit également des complications au niveau de l'exportation des lipides, comme l'illustre une augmentation du niveau de sécrétion des VLDL chez des souris obèses (Lewis *et al.*, 2002), proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'acides gras captés et stockés par le foie. Cependant, il existe un moment où le foie ne peut physiquement plus sécréter de VLDL. Il en résulte une accumulation de TG qui ne peut plus être compensée par les VLDL, ce qui conduit à une stéatose hépatique. Une autre étude réalisée sur des souris surexprimant SREBP et développant donc des stéatoses hépatiques, démontre que le taux de TG à exporter du foie vers la circulation sanguine est tellement élevé que les VLDL de personnes obèses sont environ 2 fois plus larges que ceux des personnes saines (Fabbrini *et al.*, 2008). La conséquence est que ces particules ne peuvent plus traverser les pores des capillaires sinusoides se trouvant dans le foie et donc rejoindre la circulation sanguine, ce qui résulte également en une accumulation de TG (Figure 6) (Horton *et al.*, 1999).



**Figure 6 :** Illustration des différents rôles du foie dans le métabolisme des lipides et leurs altérations en cas d'obésité. Le foie a pour rôle d'importer les acides gras, de les synthétiser, de les stocker, de les utiliser pour en faire de l'énergie mais également de les exporter. Chez le sujet obèse, il y a accumulation des TG dans le cytoplasme des hépatocytes suite à un déséquilibre entre le stockage et la libération d'acides gras. Différents facteurs peuvent en être la cause, comme une augmentation du stockage d'acides gras de la circulation sanguine due à un régime



riche en lipide ou l'élévation des concentrations plasmatiques du glucose et de l'insuline en réponse à l'ingestion de glucides. Un régime riche en lipide mène à l'activation de la lipogenèse et à une diminution de la bêta-oxidation des acides gras. Finalement, une diminution de la sécrétion des TG hépatiques due à une diminution de la sécrétion de VLDL est possible. ApoB, apolipoprotein B; FFAs, free fatty acids; FA, fatty acid; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; VLDL, very-low-density lipoprotein (Berlanga *et al.*, 2014).

### 4.2.3 *L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau du foie*

Il existe aussi une réponse inflammatoire au niveau du foie suite à l'augmentation d'expression des adipokines par le tissu adipeux. En effet, l'augmentation de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 dans le tissu adipeux résulte en une augmentation de ces molécules au niveau sanguin. Elles pourront ensuite se lier à leur récepteur au niveau du foie et mener à l'inflammation. De plus, la diminution de sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux mène aussi à l'inflammation. Puisque ces adiponectines ont un rôle anti-inflammatoire, l'hypoadiponectinémie va mener à une inflammation (Tilg et Moschen, 2010). Finalement, l'augmentation du niveau d'acides gras libres peut mener à un stress du reticulum endoplasmique, menant à l'activation de NF $\kappa$ B (Hosogai *et al.*, 2007).

## 4.3 Les muscles

D'un point de vue histologique, les fibres musculaires sont composées de myofibrilles entourées de réticulum sarcoplasmique. D'un point de vue physiologique, leur rôle est de générer de l'ATP comme source immédiate d'énergie afin de permettre la contraction. Il existe 2 classes de tissus musculaires ayant des rôles physiologiques différents mais également des utilisations des fuels énergétiques distinctes. Les fibres musculaires lentes (rouges) sont résistantes à la fatigue et produisent de l'ATP par phosphorylation oxydative. Elles sont riches en mitochondries et présentent un réseau très dense de vaisseaux sanguins. Les fibres musculaires rapides (blanches), quant à elles, ont moins de mitochondries et un réseau moins dense de vaisseaux sanguins mais peuvent développer une tension importante très rapidement. Le résultat est que ce type de fibre se fatigue plus rapidement car elles utilisent l'ATP plus rapidement que ce qu'elles ne peuvent en produire (Stevens et Lowe, 1997).

### 4.3.1 *Fonctionnement du muscle chez les individus sains*

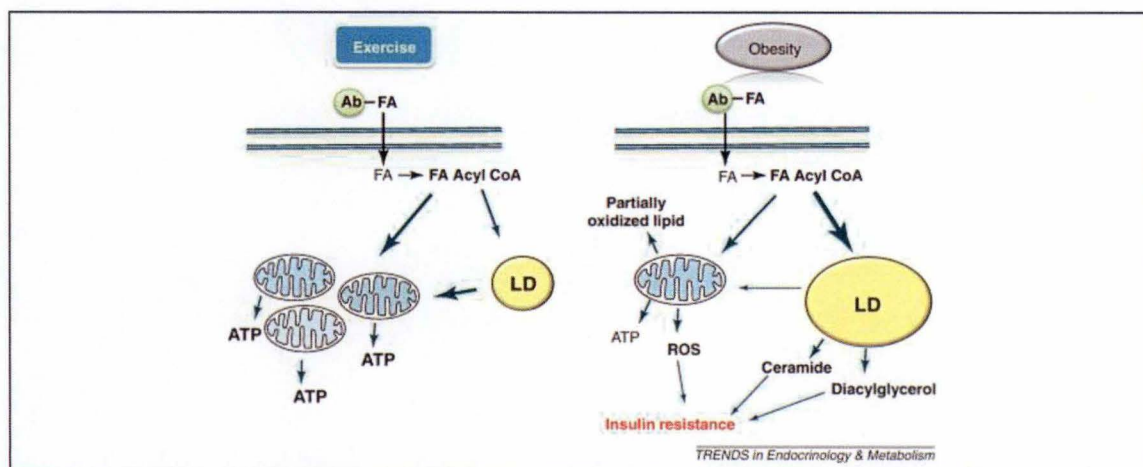
Les muscles peuvent utiliser le glucose, les acides gras ou les corps cétoniques comme source d'énergie. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés au métabolisme du glucose et des lipides. En condition de repos, le muscle utilise les acides gras provenant du tissu adipeux afin de générer de l'énergie. Ils sont oxydés, dégradés en acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle de Krebs et permettre la phosphorylation oxydative en vue de produire de l'énergie. Une activité modérée utilise le glucose sanguin, en plus des acides gras. Le glucose va être phosphorylé et transformé en pyruvate grâce à la glycolyse. Ce pyruvate va ensuite être converti en acétyl-CoA et sera également utilisé pour produire de l'ATP. En conditions d'activité intense, la demande en ATP est si élevée que les vaisseaux sanguins ne peuvent amener assez d'oxygène et de substrat. Le glycogène stocké sera donc utilisé pour la fermentation lactique, qui répond plus rapidement au besoin d'ATP que la phosphorylation



oxydative. Cependant, les quantités de glycogène étant faibles, le muscle squelettique utilise ensuite la phosphocréatine pouvant générer de l'ATP à partir d'ADP en donnant un groupement phosphate à cette molécule d'ADP (Nelson et Cox, 2008).

#### 4.3.2 Fonctionnement du muscle chez les individus obèses

Comme décrit précédemment, l'obésité est caractérisée par une augmentation d'acides gras libres plasmatiques conduisant à une élévation de lipides intracellulaires. En effet, ceux-ci représentent 3 à 4% du poids d'une personne obèse alors qu'ils ne représentent que 1 à 2% chez les individus sains (Corcoran *et al.*, 2007). L'accumulation d'acides gras résulte en une augmentation de la formation d'acyl-CoA à longue chaîne en vue de les stocker sous forme de TG. Chez les personnes obèses, il y a une diminution de la demande en énergie, le pool de TG augmente et l'oxydation des acides gras diminue. Durant l'obésité, une augmentation de stress oxydatif a été observée (**Figure 7**). Ceci proviendrait d'une oxydation incomplète des lipides due à une dysfonction mitochondriale. En effet, suite à l'augmentation de lipides, la mitochondrie va, dans un premier temps, augmenter l'oxydation de ces derniers et cela résulte donc en une augmentation de FADH<sub>2</sub> amenant les électrons pour la phosphorylation oxydative. Il en résulte donc un potentiel de la membrane mitochondriale interne plus élevé ainsi qu'une production et une consommation d'ATP moindre. Il y a donc formation de l'ion superoxyde menant à des stress oxydatifs. Par la suite, lorsque l'obésité sera bien établie, le niveau de  $\beta$ -oxydation sera très faible (Coen et Goodpaster, 2012). La seconde utilisation des acides gras à longue chaîne est la conversion en molécules de signalisation. En effet, étant donné la diminution de la  $\beta$ -oxydation, ces acides gras seront donc utilisés afin de produire des céramides ou du triacylglycérol.



**Figure 7 :** Stockage des TG dans le tissu adipeux en conditions d'exercice ou d'obésité. Taille flèches = taux de flux. LD= lipid droplet, Ab= albumine, FA= fatty acid, ROS = reactive oxygen species. (Coen et Goodpaster, 2012).

Il a été démontré que le nombre et l'activité des protéines de transport des acides gras situées sur le sarcolemme augmentent. De plus, il y aurait une relocalisation de ceux-ci au niveau du sarcolemme, permettant un transport plus important d'acides gras au niveau des muscles. Il en résulte ainsi une augmentation du niveau de lipides musculaires (triglycérides et céramides) (Coen et Goodpaster, 2012). De plus, chez des personnes diabétiques, une augmentation de TG au niveau du muscle a été observée, laissant supposer un lien entre



l'accumulation lipidique et la résistance à l'insuline (Jacob *et al.*, 1999 cité dans Coen et Goodpaster, 2012). L'accumulation des métabolites (céramides ou diacylglycérols) active des sérines/thréonines kinases telles que des protéines kinases C (PKC). Ils activent également des molécules comme IKK $\beta$  et NF $\kappa$ B. Les kinases vont cibler les enzymes de la voie de signalisation de l'insuline et induire ainsi une résistance à cette hormone. De plus, la présence de métabolites des AGL dans le muscle active la production de ROS qui mènent également à une insulino-résistance (Magnan, 2006). Cependant, le lien entre l'accumulation du stockage des acides gras au niveau du muscle et l'insulino-résistance n'est toujours pas démontré. En effet, des études ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle sans aucun changement de niveau de TG. Certains athlètes affichent même un taux élevé de TG sans pour autant être insulino-résistants. En fait, ça ne serait pas la taille des triacylglycérols intramyocellulaires qui mènerait à une insulino-résistance mais plutôt la balance entre la disponibilité en acides gras, la consommation cellulaire et l'oxydation. Finalement, il existe une différence au niveau des types de fibres musculaires des personnes obèses comparées aux personnes saines. En effet, une diminution des fibres de type I, plus efficaces pour brûler les graisses, a été observée chez ces patients. En parallèle, une augmentation du pourcentage des fibres de type II a été observée. Ceci mettrait en évidence une relation entre le type de fibres et l'obésité (Corcoran *et al.*, 2007).

### *4.3.3 L'excès d'acides gras mène à un processus d'inflammation au niveau des muscles*

Au niveau des muscles, la concentration en TNF- $\alpha$  plus élevée chez les personnes obèses, mène également à la résistance à l'insuline. En effet, le TNF- $\alpha$  diminue l'IRS-1 actif et la voie de la PI3K. Elle active également la sphingomyélinase, menant à la libération de céramides. Une autre cytokine impliquée dans l'obésité est IL-6 qui est sécrété par le tissu adipeux. Au niveau des muscles, sa régulation n'est pas entièrement comprise mais il a été mis en évidence que la concentration de cette cytokine augmentait dans le sang après un exercice, et ceci serait médié par le muscle squelettique qui semble libéré de l'IL-6 lors de contractions (Corcoran *et al.*, 2007).

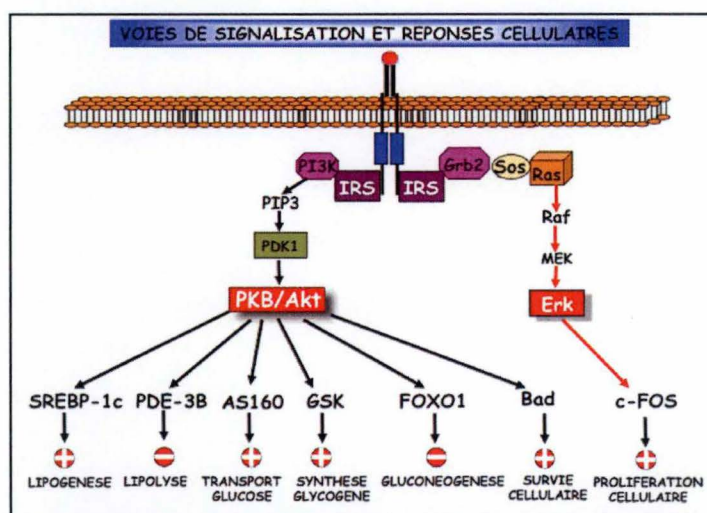
## **5. La résistance à l'insuline**

---

### **5.1 L'insuline**

L'insuline est une hormone synthétisée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, et joue un rôle essentiel de stimulation du transport des nutriments dans la cellule, mais également de régulation de l'expression de certains gènes. Elle est sécrétée après un repas, lorsque la concentration en glucose sanguin augmente. Au niveau du foie, son rôle est de stocker le glucose sanguin sous forme de glycogène dans les hépatocytes. Dans les muscles et le tissu adipeux, elle permet l'utilisation de glucose grâce à la stimulation de la translocation de GLUT 4 (un transporteur de glucose) au niveau de la membrane plasmique. Cette hormone exerce aussi une action au niveau du métabolisme lipidique en augmentant la lipogénèse et en

diminuant la lipolyse (Luca et Olefsky, 2009). Pour exercer ses effets, l'insuline se lie à son récepteur situé au niveau de la membrane plasmique, ce qui induit une dimérisation du récepteur, permettant la phosphorylation des 2 unités de ce récepteur grâce à un domaine catalytique tyrosine kinase du récepteur. Ensuite, l'« insulin receptor substrate » (IRS-1), vient se fixer au récepteur et est également phosphorylé par la tyrosine kinase. La cascade de signalisation de l'insuline active deux voies : la PI3K/AKT et la Ras/MAPK. La première permet le métabolisme des nutriments et la seconde a un effet sur la modulation de l'expression de gènes. Ensemble, ces voies de signalisation peuvent aussi contrôler la croissance et la différenciation cellulaire (**Figure 8**) (Luca et Olefsky, 2009).

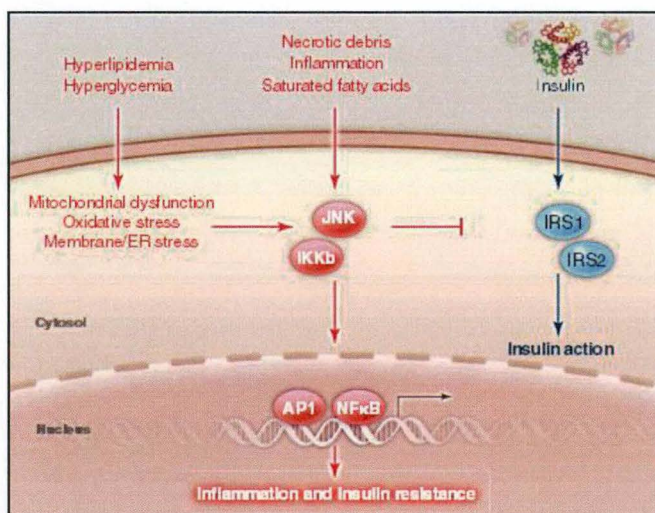


**Figure 8** : Voie de signalisation de l'insuline. La cascade de signalisation de l'insuline active deux voies : la PI3K/AKT et la Ras/MAPK. La première permet la stimulation de la lipogénèse, du transport de glucose, de la synthèse de glycogène et de la survie cellulaire. Elle permet également l'inhibition de la lipolyse et de la gluconéogenèse (Gilbert *et al.*, 2014).

## 5.2 Lien entre obésité et résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline est une conséquence majeure de l'obésité et peut mener au développement d'un état diabétique. En effet, un IMC élevé augmente le risque de diabète de type 2. La résistance à l'insuline consiste en la diminution de la consommation de glucose par la cellule, il en résulte donc une accumulation de glucose et d'insuline dans le sang (Schmitz-peiffer, 2000 ; Belfort *et al.*, 2005). Pour initier la transduction du signal, IRS-1 doit être phosphorylé au niveau des tyrosines. Cependant, il existe des kinases permettant la phosphorylation de ce substrat au niveau de la sérine 307, l'empêchant de fonctionner correctement. Parmi ces sérines kinases, on compte Ikkb et C-jun-N-terminal kinase 1 (Jnk1) mettant en lien la résistance à l'insuline et l'inflammation (Shoelson *et al.*, 2006 ; Luca et Olefsky, 2009).





**Figure 9:** La résistance à l'insuline provient de la phosphorylation de la sérine 307 de certaines molécules impliquées dans la voie de signalisation dont IRS. Lorsque les sérines kinases JNK et IKKb sont stimulées, il y a une phosphorylation de la sérine et donc une insulino-résistance. Différents facteurs peuvent activer ces sérines kinases (Odegaard et Chawla, 2013).

Il existe différentes façons d'activer ces sérines kinases (**Figure 9**):

L'hyperlipidémie et l'hyperglycémie induisent des dysfonctions mitochondriales. En effet, même si les céramides sont principalement synthétisés dans le RE, beaucoup d'enzymes impliquées dans leur synthèse résident dans la mitochondrie et le TNF- $\alpha$  permet la synthèse de ces lipides dans cet organelle. Une fois synthétisés, les céramides inhibent le complexe III de la phosphorylation oxydative dans la matrice mitochondriale. Il en résulte une fuite des électrons, ce qui causerait un stress oxydatifs (**Figure 9**) (Summers, 2006).

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les monocytes et les macrophages. Son activation stimule la voie NF $\kappa$ B via Ikkb. Il a été démontré que l'expression de TNF $\alpha$  est augmentée chez les individus obèses, expliquant pourquoi ces personnes ont tendance à être résistantes à l'insuline (**Figure 9**) (Hotamisligil *et al.*, 1993 cité dans Luca et Olefsky, 2009)

D'autres kinases peuvent phosphoryler les molécules de la voie de signalisation de l'insuline. C'est le cas de la PKC activée par le DAG (diacylglycérol) et les céramides. Le DAG est un intermédiaire du métabolisme du triacylglycérol et des phospholipides et une accumulation de cette molécule a été observée chez des souris et des humains obèses. Les céramides, quant à eux, sont dérivés de la sphingomyéline, un composant lipidique de la membrane plasmique. Il a été observé que la concentration de ces deux messagers secondaires était augmentée chez des individus diabétiques mettant en évidence le lien avec la résistance à l'insuline (Corcoran *et al.*, 2007).

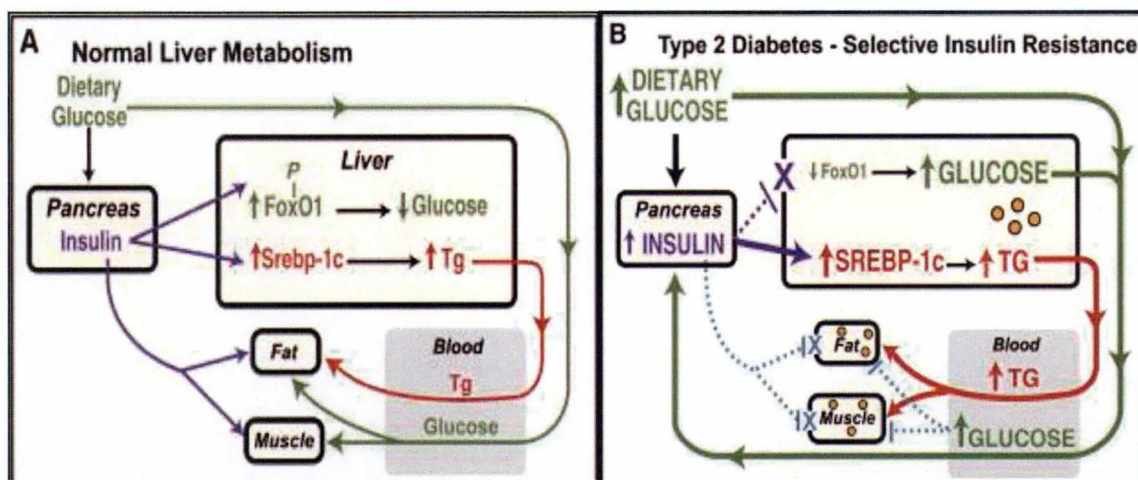
### 5.3 La double action de l'insuline dans le foie

En 2000, une étude a démontré que des souris présentant une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, et étant génétiquement déficientes pour le récepteur à l'insuline, affichaient une faible concentration en TG plasmatiques et aucune élévation des TG hépatiques. Comme expliqué précédemment, les souris obèses, quant à elles, présentent une augmentation de TG plasmatiques et hépatiques malgré une résistance à l'insuline. Ce paradoxe peut être expliqué par la double action de l'insuline au niveau du foie (**Figure 10**) (Brown et Goldstein, 2008).

En conditions normales (**Figure 10A**), le glucose ingéré stimule la libération d'insuline par le pancréas. La première action de cette hormone est la phosphorylation de FoxO1, un facteur de transcription principalement impliqué dans la synthèse de phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose 6 phosphate phosphatase (G6Pase) qui sont des enzymes de la néoglucogenèse. Une fois phosphorylé, FoxO1 ne peut plus se rendre dans le noyau pour permettre la transcription de ces gènes et il y a donc une diminution de la néoglucogenèse, permettant une diminution de glucose sanguin (Brown et Goldstein, 2008). La seconde action de l'insuline est d'activer le facteur de transcription SREBP-1c qui permet la transcription de gènes nécessaires à la synthèse des acides gras et des TG, principalement l'ACC et la fatty acid synthase (FAS) (Horton *et al.*, 1999 ; Brown et Goldstein, 2008). L'augmentation de ce facteur de transcription par l'insuline se fait grâce à deux mécanismes : elle permet l'augmentation du gène impliqué dans la transcription de SREBP1-c et elle augmente la quantité de SREBP1-c nucléaire. Il en résulte donc une augmentation du niveau de TG qui pourront être stockés au niveau du tissu adipeux grâce aux VLDL permettant leur transport au niveau sanguin (Brown et Goldstein, 2008).

Chez des souris ob/ob (**Figure 10B**), le glucose alimentaire augmente et il en résulte une augmentation de la sécrétion d'insuline. Au niveau du foie, la voie permettant l'activation du FoxO1 n'est plus activée par l'insuline. Malgré un niveau élevé de glucose sanguin, la néoglucogenèse va donc se poursuivre, élevant encore la glycémie. Cependant, la sensibilité à l'insuline est maintenue au niveau de l'activation de SREBP1-c ; ainsi la synthèse d'acide gras est augmentée et les TG s'accumulent au niveau du foie. L'excès de TG est exporté dans le sang et dans le tissu adipeux grâce aux VLDL. Les acides gras dérivés de ces TG augmentent l'état insulino-résistant de tissu adipeux et des muscles (Brown et Goldstein, 2008).





**Figure 10 :** Figure illustrant le paradoxe de la résistance à l'insuline sélective au niveau du foie. En conditions d'insulino-résistance, le facteur de transcription FoxO1 n'est plus stimulé mais SREBP-1 l'est toujours. Il en résulte donc une augmentation de la lipogenèse et donc une accumulation de TG hépatiques (Brown et Goldstein, 2008).

## 6. Le monoxyde d'azote

De nombreux articles ont mis en évidence un lien entre les métabolismes du glucose et des lipides et l'altération de la production de monoxyde d'azote (NO) (Ribiere *et al.*, 1996 ; Tsuchiya *et al.*, 2007), ce qui nous a incités à étudier les effets de cette molécule en conditions physiologiques et pathologiques.

Le NO est formé à partir de L-arginine, qui, en présence d'oxygène, va former de la L-citrulline et du NO grâce aux différentes NO synthases (NOS). Son rôle est de réguler différentes fonctions dans divers tissus comme l'inflammation, le tonus vasculaire, la régulation de la transcription de certains gènes ou la modification post-traductionnelle de protéines. Il est aussi responsable des stress oxydatifs car il peut réagir avec l'anion superoxide pour former du peroxynitrite et mener à l'oxydation ou à la nitration de biomolécules comme des protéines, des lipides ou l'ADN. Il existe trois isoformes de NOS, deux d'entre elles étant constitutives : la NOS endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) alors que la iNOS est inducible. Leur profil d'expression est différent, la eNOS étant principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales, la nNOS au niveau des cellules neuronales et squelettiques et la iNOS est synthétisée en réponse à un certain nombre de cellules inflammatoires et principalement les macrophages.

Dans le cas de l'obésité, nous nous sommes particulièrement intéressés à la iNOS et la eNOS. La plupart des études montrent en effet une expression plus élevée de la iNOS chez des souris suivant un régime riche en lipides. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la iNOS permettrait de protéger ces souris contre l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et l'augmentation de la lipolyse (Fujimoto *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2007). En effet, quand le niveau d'expression de la iNOS diminue, l'activation de certaines molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline est accrue (IRS-1 et AKT). Il semblerait que le NO produit

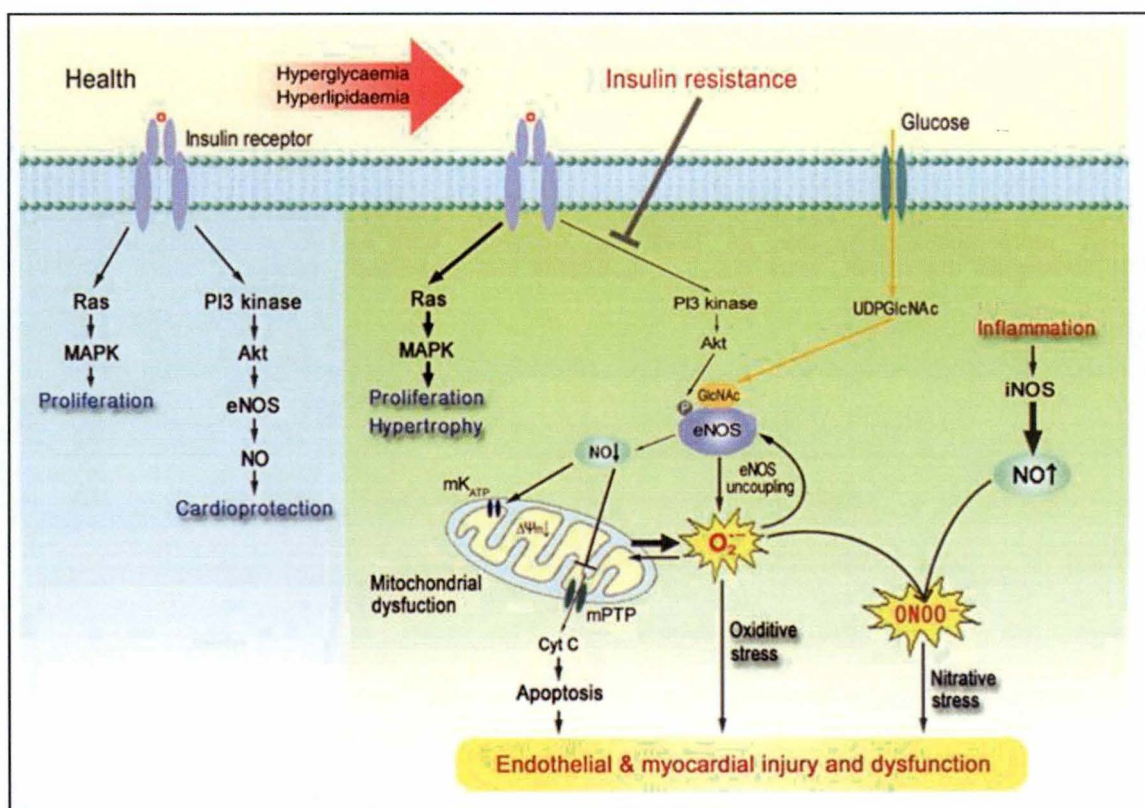
par la iNOS mène à des stress nitrosatifs et permette l'ajout de NO<sub>2</sub> au niveau des sérines ou des tyrosines d'IRS-1 et d'AKT, les empêchant d'être phosphorylées et donc d'être actives (**Figure 11**) (Yu *et al.*, 2010).

De plus, il y aurait une déficience de la eNOS en cas d'obésité (Nakagawa *et al.*, 2007). Le NO produit par la eNOS joue un rôle anti-apoptotique, vasodilatateur, anti-inflammatoire et anti-oxydant. La diminution d'expression de la eNOS et par conséquent la diminution de la production de NO peut être due à différents procédés :

- Une déficience de la biodisponibilité du substrat
- Une utilisation du NO pour les stress oxydatifs et nitrosatifs
- Une diminution du niveau d'adiponectines plasmatiques qui, en temps normal, phosphorylent la eNOS et l'activent (Van de Voorde *et al.*, 2013)
- Lors de stress oxydatifs, les espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec le NO
- Le découplage de la eNOS permet de produire des anions superoxydes qui vont réagir avec le NO pour former du peroxyde d'hydrogène ayant des effets toxiques sur les tissus
- L'hyperglycémie génère des stress oxydatifs et des inhibiteurs de NO, comme la diméthylamine asymétrique, la protéine kinase C activée et le TGF- $\beta$  (Zhao *et al.*, 2006),
- Pour fonctionner correctement, la eNOS a besoin d'être dimérisée et phosphorylée. L'AKT peut être responsable de cette phosphorylation. Cependant, lors d'insulino-résistance, cette molécule n'est plus active et ne peut donc plus activer la eNOS (YU *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2012).
- Il a aussi été prouvé qu'une concentration élevée en glucose altérerait la dimérisation de l'enzyme et sa phosphorylation (Fruebis *et al.*, 2001).

Le TNF- $\alpha$ , présent en grande quantité chez les sujets obèses, permet la stimulation de la iNOS mais diminue également la sensibilité des cellules endothéliales à exprimer la eNOS. Au vu de tous ces éléments, il est aisément compréhensible qu'en cas d'obésité, une augmentation en iNOS et une déficience en eNOS et en NO sont observées.





**Figure 11 :** Voie de signalisation de l'insuline en conditions physiologiques et en conditions d'hyperglycémie/hyperlipidémie. En conditions pathologiques, les 2 voies de signalisations Ras/MAPK et PI3k-AKT sont affectées. Une diminution de l'activité d'AKT diminue la phosphorylation de la eNOS. En plus, une augmentation de glucose induit une glycosylation de cette NOS ce qui diminue la synthèse de NO, mène à des dysfonctions mitochondriales, à une augmentation de radicaux libres et à un découplage de la eNOS. Il en résulte de l'apoptose et des stress oxydatifs. En outre, l'inflammation augmente la production de iNOS, ce qui mène à des stress nitrosatifs et génère du peroxynitrite (à partir de NO et de radicaux libres). Ceci contribue directement à des troubles endothéliaux et cardiaques ainsi qu'à des dysfonctions au niveau de la voie de signalisation de l'insuline. Akt : protein kinase B; Cyt C : cytochrome c; eNOS : endothelial nitric oxide synthase; GlcNAc : N-acetylglucosamine; iNOS : inducible NOS; MAPK : mitogen-activated protein kinase; mK<sup>+</sup>ATP : mitochondrial K<sup>+</sup>-ATPase; mPTP : mitochondrial permeability transition pore; PI3K : phosphatidylinositol 3'-kinase; P : phosphorylation (Yu *et al.*, 2011).

L'action du NO est difficile à étudier car cette molécule réagit très vite avec l'oxygène, les radicaux superoxydes ou le peroxyde d'hydrogène afin de former respectivement du NO<sub>2</sub>, du peroxynitrite et du nitrite/nitrate (Henry *et al.*, 1991 cité dans Andersson *et al.*, 1999). Il existe néanmoins différentes approches qui permettent d'étudier le rôle de ce médiateur. En effet, nous pouvons soit ajouter un donneur de NO pour étudier l'effet des enzymes soit un inhibiteur sélectif (pour mettre en évidence l'effet d'une des 3 NOS) ou non-sélectif des NOS de façon à diminuer la synthèse de NO. De cette façon, il est facile de mettre en évidence un changement pathologique lié à des altérations de production de NO. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser le L-N(6)-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL), un inhibiteur spécifique de la iNOS.

### **7. Objectifs du mémoire**

---

Au vu de ces éléments, l'objectif de ce travail est d'évaluer l'importance de l'implication du NO dans le développement de la résistance à l'insuline et l'inflammation en cas d'obésité au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles. Pour ce faire, des souris C57BL/6 âgées de 6 semaines ont été utilisées et ont été nourries avec un régime pauvre (LFD = low fat diet) ou riche en lipides (HFD = high fat diet) et ce, sur une durée de 16 semaines. Ces souris semblent être les mieux adaptées pour étudier l'obésité puisqu'elles possèdent un grand nombre de caractéristiques communes aux humains. En effet, lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en lipides, les altérations des différents organes semblent être similaires à celles observées chez l'homme. Pour évaluer l'impact du NO en condition d'obésité, ces souris ont été traitées par administration orale d'un agent pharmacologique inhibant le NO produit par la iNOS : le L-NIL qui inhibe la iNOS de façon spécifique. Ces NOS présentent des propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydantes. Une trop grande production de NO par la iNOS peut s'avérer néfaste sur le système vasculaire, contrairement à la eNOS qui possède des effets bénéfiques.



# **MATÉRIEL & MÉTHODES**



### 1. Groupes expérimentaux

---

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de cette étude, une partie des analyses ont été effectuées sur les tissus et le plasma d'échantillons obtenus au cours d'un protocole expérimental réalisé l'année dernière dans notre laboratoire (Depommier, Master BBMC 2013-2014, Unamur). Trente-huit souris mâles C57Bl/6 wild-type âgées de 6 semaines (Harlan Laboratory – UK) ont été utilisées. Toutes les procédures effectuées sur les animaux ont été approuvées par le comité éthique local (CEEXPANI). Le local hébergeant les souris est soumis à une température constante de 21°C et l'humidité est contrôlée régulièrement. L'éclairage de l'hébergement suit un cycle jour/nuits de 12h/12h.

Afin d'étudier l'impact d'un régime alimentaire riche en acide gras sur certaines variables physiologiques, les souris ont été divisées en 2 groupes expérimentaux basés sur 2 régimes alimentaires différents :

- Un régime contrôle pauvre en graisses (**LFD** - Low Fat Diet – D12450J) constitué, en termes de calories, de 10 % de graisse, de 20 % de protéines et de 70 % d'hydrates de carbone (5,24 Kcal/g). La nourriture nous a été fournie par la société Research Diets (New Brunswick, NJ, USA).
- Un régime riche en graisse (**HFD** - High Fat Diet – D12492) constitué, en termes de calories, de 60 % de graisses, de 20 % de protéines et de 20 % d'hydrates de carbone (3,84 Kcal/g). La nourriture a été fournie par la société Research Diets (New Brunswick, NJ, USA).

La procédure expérimentale s'est étendue sur 16 semaines. Quatre groupes expérimentaux ont été constitués, certains ayant fait l'objet d'un traitement pharmacologique qui consistait en l'administration orale de L-NIL (BACHEM, Suisse) qui est un inhibiteur spécifique de la iNOS. Celui-ci a été dissous dans l'eau de boisson avec une concentration finale de 0,1 %.

Les 4 groupes expérimentaux étaient les suivants :

- LFD sans traitement (n=12)
- LFD avec traitement par administration orale de L-NIL (n=6)
- HFD sans traitement (n=13 souris)
- HFD avec traitement par administration orale de L-NIL (n=8)

Après 16 semaines, les souris ont été euthanasiées grâce à une injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/Kg, SVA usine, Belgique) et de médétomidine (0,5 mg/Kg, Bayer, Belgique).

### 2. Cages métaboliques

---

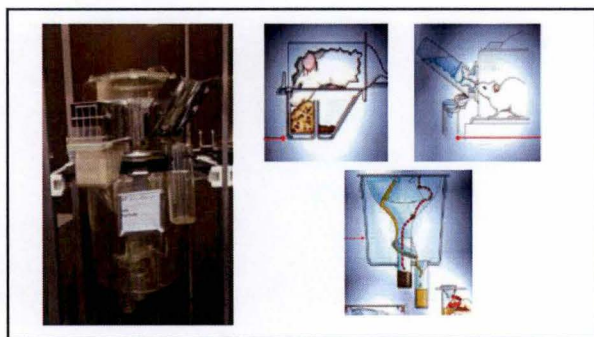
Au cours des semaines 0, 1, 4, 8 et 16, les animaux ont été placés en cages métaboliques pour collecter l'urine et contrôler la quantité de nourriture et d'eau ingérée. Une phase d'acclimatation a tout d'abord été prévue pendant 48 heures, suivie d'une période de récolte des urines de 2 x 24 heures. Ces cages ont pour utilité de séparer les excréments des urines (**Figure 12**). Le poids de chaque pot (urine, nourriture, biberon) est mesuré avant et après la



mise en cage. De cette façon, il est possible de mesurer la quantité exacte de nourriture et d'eau ingérée ainsi que le volume urinaire excrété. Le pot contenant l'urine est rempli d'1 ml de paraffine avant utilisation de façon à éviter une évaporation de l'urine. A la sortie des cages métaboliques, les souris et les pots sont de nouveau pesés.

Selon la même séquence temporelle, la concentration en glucose sanguin a été mesurée après 6 heures de mise à jeun (OneTouchVita, LifeScan, USA). Le système consiste en un capillaire sur lequel une goutte de sang est placée. Cette goutte est prélevée au niveau de la veine caudale à l'aide d'un tube de contention dans lequel la souris est placée et permettant juste le passage de sa queue afin de pouvoir y prélever une goutte de sang. La bande réactive est ensuite placée dans le lecteur OneTouch® Vita™ (Lifescan Benelux, Belgique) dont l'écran affiche la glycémie en mg/dl.

Une fois collectés, les échantillons d'urines ont été centrifugés (2500 tours par minutes) pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer la paraffine contenue dans les tubes de récolte. Les échantillons ont ensuite été aliquotés (100 µl par eppendorf - maximum 10 eppendorfs par animal). Les aliquots ont été conservés à -80°C pour de futures analyses.



**Figure 12 :** Agencement des cages métaboliques

### 3. Echantillons biologiques

---

Après 16 semaines de protocole, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/Kg, SVA usine, Belgium) et de médétomidine (0,5 mg/KG, Bayer, Belgium). Les souris ont été euthanasiées par ponction intracardiaque, ce qui nous a permis d'obtenir un volume maximal d'échantillon sanguin. Les souris ont ensuite été soumises à une dislocation cervicale afin de pratiquer la double euthanasie. Les échantillons sanguins ont été collectés et les reins, le foie, les muscles et le tissu adipeux (graisse viscérale et péri-rénale) ont été pesés pour analyses. Une partie du foie, du cœur, du tissu adipeux et des reins a été fixée dans une solution de Bouin (picric acid 1%, formol 40%) ou de PAF (paraformaldehyde - 40 mg/ml), et enrobée dans de la paraffine. Une partie des tissus (Cœur, rein et foie) a été placée dans de l'OCT (Optimal cutting temperature – fixation spécifique pour la réalisation de coupes congelées). Le tissu restant a été congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C pour de futures analyses. Les échantillons sanguins prélevés sur glace, dans des

tubes héparinés ont été centrifugés à 4500g pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma a ensuite été récupéré et stocké à -80°C.

### 4. Approches analytiques

---

#### 4.1 Dosage de l'insuline

La concentration plasmatique d'insuline a été déterminée grâce à un kit ELISA (EMD Millipore, Missouri) sur base d'une plaque 96 puits précoatée avec un anticorps monoclonal anti-insuline de souris. Premièrement, 10 µl de chaque échantillon ont été ajoutés dans les puits correspondants de façon à ce que l'insuline se lie à l'anticorps de la plaque. De plus, une solution standard a été ajoutée à différentes concentrations afin de réaliser une courbe standard. Deux contrôles de qualité ont également été ajoutés pour mettre en évidence la qualité des résultats car les valeurs doivent se situer entre ces deux contrôles. Ensuite, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté et les puits ont été lavés trois fois grâce à du tampon TBS tween. Cent µl de «*streptavidin-horseradish peroxidase*» ont été ajoutés ainsi que le substrat de l'enzyme (3,3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine). Après 5 à 20 minutes, l'enzyme permet au substrat de former un produit bleu détectable à 450 et 590 nm au spectrophotomètre (Molecular devices – Versa max Microplate reader – USA) après l'ajout d'une solution stop contenant du HCl 0,3M. Puisque l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration d'insuline plasmatique, nous avons pu évaluer la concentration d'insuline présente dans chaque échantillon.

#### 4.2 Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides est effectué sur des échantillons de plasma (Triglycerides FS, Diasys, France), en utilisant un test enzymatique colorimétrique utilisant l'enzyme «*glycerol-3 phosphate oxidase*» (GPO) (Diasys, Diagnostic System, Holzheim, Germany). Pour commencer, 2 µl d'échantillon non dilué, de standard et de blanc ont été ajoutés dans les puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, 200 µl de réactif ont été ajoutés dans chacun de ces puits. Ce réactif contient la LPL (= «*lipoprotein lipase*») qui génère du glycérol et des acides gras à partir des triglycérides. Ensuite, la «*glycerokinase*» (GK) utilise ce glycérol pour générer du «*glycerol-3-phosphate*» et cette molécule est utilisée par la GPO pour former du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Enfin, la peroxydase (POD) génère un indicateur quinone imine à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après avoir laissé la plaque à température ambiante pendant 20 à 60 minutes, l'absorbance à 560 nm a été mesurée.

#### 4.3 Méthode d'homogénéisation en trois phases

Cette méthode permet la séparation du tissu homogénéisé en 3 phases (Declèves *et al.*, 2013):

- Méthanol contenant de l'eau et les sucres



- Une partie solide contenant les protéines et l'ARN
- Chloroforme contenant les lipides dont les NEFA et les TG

Pour réaliser cette technique, la première étape consiste à réaliser un mix contenant 15,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>Q</sub>, 4 ml 1M HCl et 0,8 ml 5M NaCl. Ce mix a été mélangé avec du méthanol dans des proportions 1:4 respectivement. Ensuite, 30 à 90 mg de tissu congelé ont été mélangés à 700 µl du mix méthanol, HCl, NaCl et homogénéisés grâce à un homogénéiseur (Tenbroeck, Kimble/Kontes Glass Co, Vineland, NJ). Le méthanol acide est un mix entre 0.2N HCl et 0.2M NaCl (4:1 mix). Trois-cent dix µl de chloroforme ont été ajoutés pour la première phase d'extraction, suivi par un mélange au vortex pendant 30 secondes pour extraire et dénaturer toutes les protéines. La seconde phase d'extraction a été réalisée grâce à l'ajout de 250 µl de chloroforme et 300 µl d'eau. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16,000g durant 10 minutes à 4°C pour séparer les phases. La phase supérieure constituée de méthanol a été stockée dans des eppendorfs à -80°C et utilisée pour le dosage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Amplex Red, Invitrogen). La phase inférieure constituée de chloroforme a également été stockée à -80°C dans des tubes empêchant le passage de la lumière. Cette phase a été utilisée pour le dosage des triglycérides (DiaSys Diagnostic System, Holzheim, Germany) et des acides gras non-estérifiés (NEFA-HR, Wako, Germany). La phase intermédiaire sera utilisée pour extraire les protéines.

### 4.3.1 Dosage des triglycérides

La phase chloroforme est utilisée pour le dosage des triglycérides. Le protocole utilisé est le même que pour le dosage des triglycérides dans le plasma.

### 4.3.2 Dosage des acides gras non-estérifiés (NEFA)

Pour quantifier les NEFA dans la phase chloroforme, une méthode enzymatique a été utilisée (NEFA-HR (2) R2 set, WAKO, Germany). Cette méthode consiste en l'ajout d'« *acyl-CoA synthetase* » (ACS) aux NEFA, permettant ainsi la formation d'acyl-CoA. Ensuite, l'acyl-CoA est oxydé par ajout d'« *acyl-CoA oxidase* » (ACOD) et donne du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui, en présence de POD, permet la condensation oxydative « *3-methyl-N-ethyl-N-aniline* » (MEHA) avec le « *4-aminoantipyrine* », formant un produit violet dont on peut mesurer l'absorbance.

Tout d'abord, un flacon de colorant A contenant l'ACS a été mélangé au solvant A contenant le tampon phosphate et le sodium azide formant un réactif appelé R1. La même procédure a été suivie pour le colorant B contenant l'ACOD et la POD qui a été mélangé au solvant B contenant le MEHA, formant un réactif appelé R2. Les standards ont ensuite été préparés à différentes concentrations. Dans une plaque 96 puits, 5 µl des différents standards, de blanc et des échantillons dilués 5X ont été déposés. Ensuite, 200 µl de R1 ont été ajoutés. Après avoir mélangé et incubé à 37°C pendant 5 min, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 550 nm (abs 1). Finalement, le R2 a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à 550 nm après un temps d'incubation de 5 minutes à 37°C (abs 2). Pour obtenir la courbe standard et pouvoir mesurer la concentration de chaque échantillon en fonction de l'absorbance, l'abs 2 est soustraite de l'abs 1.



### 4.4 Dosage du monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)

Pour mesurer la quantité de MCP-1 et donc mettre en évidence l'inflammation, une homogénéisation des tissus a été effectuée comme suit : 40 à 60 mg de tissus ont été ajoutés à 500 µl de tampon RIPA (*cell signaling technology*, USA), qui permet la lyse du tissu. A cela, un inhibiteur de protéase a été ajouté de façon à éviter une dégradation des protéines par les protéases (5 µl/500 µl). L'homogénéisation a été réalisée à l'aide d'un potter et d'un homogénéiseur (Tenbroeck, Kimble/Kontes Glass Co, Vineland, NJ).

Pour le dosage de MCP-1, un kit ELISA a été utilisé (BD OptEIA™, 877.232.8995, BD Biosciences, San Diego, USA). Premièrement, un anticorps (1 :250) monoclonal spécifique de MCP-1 a été coaté overnight sur une plaque 96 puits. Ensuite, les standards, le blanc et les échantillons ont été ajoutés et laissés pendant 2 heures afin que le MCP-1 présent dans les échantillons puisse se lier à l'anticorps spécifique. Après avoir lavé les puits, la « *streptavidine-horseradish peroxidase* » et l'anticorps biotinilé anti-souris ont été ajoutés, ce qui conduit à la formation d'un composé bleu. Finalement, une solution stop a été ajoutée transformant le composé bleu en composé jaune et l'absorbance a été lue à 450 nm. Une courbe standard a permis de calculer la quantité de MCP-1 présente dans l'échantillon en fonction de l'absorbance.

## 5. Analyses morphologiques

---

### 5.1 Coloration hématoxyline et éosine

De façon à mettre en évidence les lésions au niveau du foie et de la graisse péri-rénale, une coloration hématoxyline et éosine a été réalisée sur des lames en paraffine. Premièrement, les lames ont été déparaffinées en étant plongées dans 2 bains successifs de toluène durant 5 minutes, suivis de 3 bains d'éthanol 95°C durant 3 minutes. Ensuite, ces lames ont été réhydratées en étant placées dans l'eau courante pendant 10 minutes. Les lames ont ensuite été déposées dans l'hématoxyline pendant 7 minutes afin de colorer les noyaux en bleu-noir. Après avoir rincé les lames à l'eau distillée et à l'eau de ville, ces dernières ont été plongées dans une solution d'éosine aqueuse 5% dans le but de colorer le cytoplasme et la matrice extracellulaire en rose-rouge. Après un rinçage très bref dans l'eau distillée et l'eau de ville, les lames ont été passées dans différents bains d'alcool, à savoir :

- Alcool 70%
- Alcool 90%
- Alcool absolu
- Toluène

Finalement, les lames ont été montées grâce au dépôt d'une fine lamelle couvre-objet. Au niveau du tissu adipeux, nous avons quantifié le nombre d'adipocyte et mesuré leur taille. Pour cela, nous avons utilisé une méthode d'analyse d'image automatique basée sur l'analyse de photos d'adipocytes et mesurant la taille des cellules en µm<sup>2</sup> (Osman et al., 2013).

### 5.2 Coloration oil red O

La coloration oil red O (IHC world, Australia) permet de mettre en évidence les lipides neutres en les colorants en rouge. Cette coloration se fait sur des blocs OCT ayant été coupés à une épaisseur d'environ 10  $\mu\text{m}$  et déposés sur une lame pour ensuite être fixés dans du formaldéhyde. Pour commencer, il est nécessaire de préparer une solution stock d'oil red O pouvant être conservée à température ambiante. Pour cela, 0,5 g d'oil red O ont été ajoutés à 100 ml d'isopropanol. Ensuite, une « working solution » a été réalisée en diluant 30 ml de cette solution stock dans 20 ml d'eau. Avant utilisation, la « working solution » a été filtrée pour éliminer les résidus de poudre qui pourraient éventuellement rester dans la solution. Les lames ont été colorées dans la solution oil red O durant 15 minutes et rincées à l'isopropanol 60%. Ensuite, elles ont été plongées 5 fois dans l'hématoxyline, de façon à colorer le noyau en bleu. Finalement, les lames ont été rincées à l'eau distillée et montées grâce à un milieu aqueux permettant de coller la lame couvre-objet à la lame.

### 5.3 Immunohistochimie

#### 5.3.1 *Pré-traitement*

Premièrement, les lames ont été déparaffinées en étant plongées dans 2 bains successifs de toluène durant 5 minutes, suivis de 3 bains d'éthanol 95° durant 3 minutes. Ensuite, ces lames ont été réhydratées en étant placées dans l'eau courante pendant 10 minutes.

Lorsque l'on fixe le tissu, le fixateur peut modifier la configuration spatiale des épitopes et donc leur accessibilité aux anticorps. Pour démasquer les antigènes, 2 méthodes ont été utilisées :

Le démasquage au tampon citrate (Sigma-Aldrich, USA) 0,01 M à pH 6,2 a été réalisé en diluant le citrate 10 fois dans de l'eau distillée. Les lames sont plongées dans le récipient contenant le tampon citrate et laissées au micro-onde à 800 Watts pendant 3 minutes et à « defrost » pendant 10 minutes. Finalement, le récipient de citrate contenant les lames a été laissé à température ambiante pendant 20 minutes.

Concernant le démasquage à l'EDTA (« *ethylenediaminetetraacetic acid* »), la dilution était également de 10 fois dans de l'eau distillée. Le récipient contenant le tampon et les lames a été déposé dans le micro-onde pendant 3 minutes à 650 Watts et ensuite, laissé 30 minutes à température ambiante.

Après le démasquage, les lames ont été plongées dans un bain de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,06%) durant 5 minutes ou plus longtemps en fonction du bruit de fond car cette action permet de bloquer l'activité des peroxydases endogènes. Ensuite, les lames ont été rincées dans de l'eau distillée et dans du tampon PBS pH 7,4.

Dans une chambre humide, les lames ont été traitées avec de l'avidine (Vector Laboratories, Inc., USA), diluée 100 fois, afin d'inhiber la biotine endogène. L'avidine possède



environ 4 sites de liaison spécifiques à la biotine qu'il ne faut pas laisser libre pour éviter une fixation non-spécifique de l'anticorps secondaire. Les lames ont donc été traitées à la biotine, diluée 100 fois, et rincées dans du tampon PBS.

### 5.3.2 Immunohistochimie

Les lames ont été incubées overnight avec l'anticorps primaire dans une chambre humide pour éviter une déshydratation du tissu. Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants : macrophages (overnight, 1/50, Rat mAB clone RM0029-11H3, Abcam, England), eNOS (2 h, 1/75, lapin Pab RB-9279-P1, NeoMarkers Fremont, CA), phospho-IRS-1 (SER 612) (Overnight, 1/50, lapin Pab 09-448, millipore, USA) et nitrotyrosine (Overnight, 1/100, lapin Pab Millipore, USA). Le lendemain, les lames ont été rincées avec du tampon PBS et incubée avec l'anticorps secondaire. Les anticorps secondaires utilisés étaient les suivants : anticorps anti-rat pour les macrophages (30 min 1/50 AbD Serotec, Royaume-Unis) et anti-lapin pour eNOS, phospho-IRS-1 et nitrotyrosine (30 min 1/50, Dako, Danemark). Ensuite, les lames ont été rincées dans du PBS et traitées avec de la streptavidine peroxydase dans le but d'amplifier le signal.

Après un lavage au PBS, les lames ont subi la révélation de l'antigène grâce à une solution de Diaminobenzidine (DAB) 0,05% (Sigma, USA) dans du PBS contenant 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les peroxydases réagissent avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ce qui permet l'oxydation du DAB et celui-ci forme un composé brun-noir au microscope quand il précipite. Lorsque le marquage est spécifique était optimal, les lames ont été plongées dans de l'eau distillée pour arrêter la réaction.

Ensuite, les lames ont été plongées 1 minute dans l'hémalum qui colore le noyau en brun. Après rinçage à l'eau distillée et à l'eau de ville, les lames ont été colorées au luxol qui marque le cytoplasme en bleu.

Finalement, elles ont été montées grâce au dépôt d'une fine lamelle couvre-objet.

## 6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

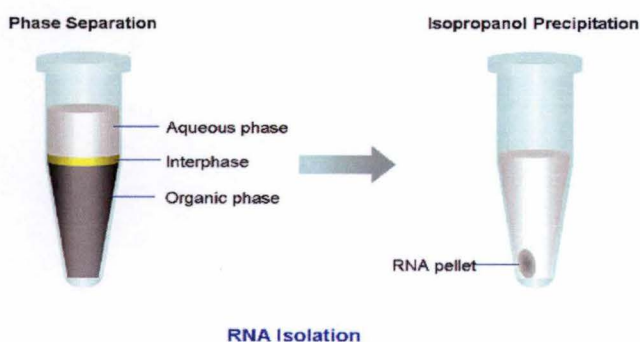
---

Cette technique permet d'évaluer les niveaux de transcription des gènes codant pour MCP-1 au sein du foie et du tissu adipeux. En fait, la qPCR permet de mettre en évidence l'amplification de la séquence d'ADN grâce au Sybrgreen qui est une molécule fluorescente. Cette technique se déroule en 3 étapes.

### 6.1 Extraction de l'ARN

Les ARNm présents dans les échantillons ont été extraits grâce au trizol (TRI reagent, Sigma, USA). La réalisation de cette méthode nécessite des conditions RNase free pour éviter une dégradation des ARN présents dans l'échantillon. Premièrement, les tissus ont été homogénéisés grâce au trizol et traités avec du chloroforme (VWR, France). Ensuite, une

première étape de centrifugation a été réalisée à 4100g pendant 20 minutes à 4°C. Cette étape est nécessaire afin de conserver la phase aqueuse contenant l'ARN en surface (**Figure 14**). Ensuite, l'« *isopropyl alcohol* » (Merck, Allemagne) a été ajouté et après une seconde centrifugation de 15 minutes à 12000g à 4°C, l'ARN s'est retrouvé dans le culot et le surnageant a donc été enlevé. Finalement, de l'éthanol 75% (Univar Blandain, Belgique) a été ajouté pour laver le culot et une dernière centrifugation de 5 minutes à 7500g a été réalisée afin de récupérer un maximum d'ARN. Une fois l'ARN récupéré, un traitement à l'ADNase (Proméga, Belgique) a été réalisé afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique dans les échantillons. Enfin, un dosage de la concentration en ARN a été réalisé afin de connaître le volume à prélever pour obtenir 2 µg d'ARN nécessaires pour l'étape suivante. Pour cela, le Nanodrop 1000 a été utilisé (NanoDrop 1000, spectrophotometer Thermo Scientific, USA).



**Figure 14** : Extraction grâce au trizol et séparation en 3 phases. Après ajout d'isopropanol et centrifugation de la phase aqueuse, l'ARN se retrouve dans le culot (Ali, 2012).

## 6.2 Transcription inverse

La transcription inverse permet de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Pour cela, 2 mix ont été préparés (mix +RT et mix -RT) contenant tous deux 6 µl du mélange ARN et eau RNase free, 7 µl d'eau RNase free, 1 µl de dNTP, 4 µl de tampon MLV-RT (virus de la leucémie murine), 1 µl de random hexamer 1/10 et 1 µl de MLV-RT pour le mix + RT. Pour le mix -RT, 1 µl d'eau RNase free ont été ajoutés à la place de la MLV-RT. Tous les échantillons subissent la RT PCR, 1 échantillon par groupe subit la RT-PCR mais sans la MLV-RT. A cela, il faut ajouter 2 blancs (1 avec enzyme et 1 sans enzyme) et 4 références dont on connaît la concentration d'ARN (3 avec enzyme et 1 sans enzyme). Avant d'ajouter les mix, les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 8 minutes et ensuite conservés à 4°C. Ensuite, les mix ont été ajoutés et des incubations pendant 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C et 15 minutes à 70°C ont successivement été réalisées. Finalement, les échantillons ont été aliquotés avec un volume de 10 µl (= solution stock) et les 10 autres µl ont été déposés dans un second tube auquel 90 µl d'eau RNase free ont été ajoutés (= solution prête à l'emploi).



### 6.3 qPCR (real time PCR)

Les séquences d'ADN codant pour les gènes d'intérêts ont été amplifiées par PCR quantitative grâce à des amorces. En effet, celles-ci viennent se placer de part et d'autre de la séquence d'intérêt. Sur la plaque, 15 µl de mix et 5 µl de ADNc ont été déposés dans chaque puits. Finalement, la plaque a été centrifugée à 4500g pendant 3 minutes et a été placée dans la machine Real-Time PCR (7300 RT-PCR System, Applied Biosystems). Le Sybrgreen est un agent intercalant qui va permettre de mettre en évidence l'amplification de l'ADNc. Il faut noter qu'un housekeeping gène est nécessaire afin d'avoir un contrôle. Dans notre cas, il s'agit du 18S.

## 7. Western blot

---

### 7.1 Dosage protéique

Pour mettre en évidence la présence de molécules de la voie de signalisation de l'insuline, un western blot a été effectué. Tout d'abord, les échantillons ont été préparés en homogénéisant les tissus de la même façon que pour le dosage du MCP-1. Ensuite, les protéines ont été dosées afin de calculer le volume nécessaire pour avoir 35 µg de protéines. Pour cela, un kit « *pierce BCA protein assay* » (thermo Scientific, USA) a été utilisé. Deux-cent µl de « working reagent » ont été ajoutés à chaque puits contenant les standards (albumine de sérum bovin), le blanc et les échantillons de façon à réaliser une courbe standard et à calculer ainsi la concentration protéique dans l'échantillon. Ensuite, la plaque a été incubée à 37°C pendant environ 30 minutes et l'absorbance a été lue à 562 nm. Celle-ci est directement proportionnelle à la concentration tissulaire.

### 7.2 Préparation des gels

La première étape consiste à réaliser un gel de migration à base d'eau, d'acrylamide 30%, du Tris HCl ayant un pH de 8,8, du Sodium Dodecyl Sulfate 10% (SDS) ainsi que du persulfate d'ammonium (APS) et du Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) à ajouter en dernier lieu car ces deux agents permettent la polymérisation. Ce gel de migration permet la migration des protéines à travers le gel en vue de permettre leur séparation en fonction de leur poids moléculaire. Ensuite, le gel de chargement a été ajouté, ainsi que le peigne pour la formation des puits. Ce gel a été réalisé avec les mêmes réactifs que pour le gel de migration mais le Tris-HCl possédait un PH de 6,8. Son but est de permettre l'entassement des protéines avant leur séparation. Les concentrations de chacun des composés varient en fonction du type de gel et de son degré de polymérisation.

### 7.3 Préparation des échantillons

Avant de mettre le volume exact d'échantillons dans les puits, 4  $\mu$ l de solution alourdisante et de  $\beta$ -mercapto-éthanol ont été ajoutés. La solution alourdisante contient un colorant bleu permettant la visualisation de la migration. Le  $\beta$ -mercapto-éthanol, quant à lui, réduit les ponts disulfures des protéines afin de faciliter leur migration. Ensuite, le volume d'eau nécessaire a été ajouté afin d'obtenir un volume total de 20  $\mu$ l. Il a ensuite fallu faire bouillir les échantillons et finalement les centrifuger pour récupérer un volume maximal.

### 7.4 Migration des échantillons

Les gels ont été placés dans une cuve avec un tampon de migration (Tris-HCl + Glycine + SDS, pH : 8.5). Ensuite, 8  $\mu$ l d'étalon protéique ont été ajoutés dans les puits. Celui-ci permet d'avoir un repère de poids moléculaire puisque chaque bande correspond à un poids moléculaire précis. Vingt  $\mu$ l de chaque échantillon ont ensuite été ajoutés dans les autres puits. La cuve a été remplie de tampon de migration jusqu'à la moitié lorsque 2 gels ont été réalisés et remplie entièrement lorsque 4 gels ont été réalisés. Le voltage appliqué est un voltage constant de 180V.

### 7.5 Transfert

Le gel, les éponges et les papiers ont été plongés dans le tampon de transfert. En ce qui concerne la membrane PVDF (polyvinylidène fluoride), celle-ci a été traitée au méthanol (Prolabo Chemicals, France) pendant une minute afin de l'activer et de lui permettre de fixer les protéines. Ensuite, elle a été rincée avec de l'eau pour enlever toutes les bulles et a finalement été plongée dans le tampon de transfert (Tris-HCl + glycine, pH : 8.5). Le montage a été réalisé comme suit :

- 1 éponge
- 3 papiers
- le gel avec l'étalon à droite
- la membrane
- 3 papiers
- 1 éponge

Cette fois-ci, c'est l'ampérage qui était constant et était de 0,3 A. Le transfert a été réalisé pendant 45 minutes.

### 7.6 Blocage

Le but du blocage est de saturer les sites antigéniques aspécifiques afin de minimiser le bruit de fond. Pour cela, la membrane a été plongée dans du lait 5% dilué dans du « PBS tween » pendant minimum 20 minutes.



### 7.7 Anticorps

Les différents anticorps primaires utilisés étaient les suivants :

- AKT (1/200, Santa cruz biotechnology, Texas, USA)
- Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, 1/3000)

Chacun étant dilués dans du PBS du tween et du lait et déposé sur la membrane durant toute la nuit en chambre froide et sur agitateur. Le lendemain, la membrane a été rincée 3 fois 20 minutes avec du PBS tween et l'anticorps secondaire HRP dilution 1/3000 également dans du PBS + Tween + lait a été ajouté (incubation 1 heure). Il s'agit d'un anticorps secondaire anti-mouse pour la GAPDH (Dako, Glostrup, Danemark) et anti-rabbit (Dako, Glostrup, Danemark) pour l'AKT. Ensuite, 3 bains de 20 minutes au « PBS + tween » ont de nouveau été réalisés.

### 7.8 Révélation

Finalement, la membrane a été incubée pendant 5 minutes dans du substrat de révélation (Perkin Elmer, Waltham, USA). Pour ce faire, le réactif A (« *Enhanced Luminol Reagent* ») a été ajouté au réactif B (« *Oxidizing reagent* ») dans des proportions 50/50. Ensuite, la membrane a été placée dans une cassette et, dans la chambre noire, un film (Amersham hyperfilm ECL, Royaume-Unis) a été placé au-dessus. Finalement, le film est passé dans la machine (Fuji Photo Film CO., LTD, Japon) qui permet de révéler le signal. Finalement,, une densitométrie a été réalisée afin de quantifier les bandes. Le programme ImageJ Macbiophotonics a été utilisé et une normalisation des valeurs a été effectuée grâce aux bandes de GAPDH.

## 8. Analyses statistiques

---

Les données présentées sont des moyennes  $\pm$  SEM. La limite de signification a été définie à  $P < 0,05$ . Un test de variance one-way ANOVA a été réalisé pour comparer les moyennes entre les différents groupes d'animaux. Un post-test paramétrique de Newman Keuls a été réalisé pour mettre en évidence les différences significatives entre les LFD, LFD + L-NIL, HFD et HFD + L-NIL.

# RÉSULTATS



## RESULTATS

Lors d'une précédente étude effectuée au sein de notre laboratoire, les atteintes rénales consécutives à l'exposition de souris à un régime alimentaire riche en graisses (HFD) ont été caractérisées, tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Il s'agit principalement d'une hypertrophie glomérulaire, de l'épaississement de la membrane basale glomérulaire, d'une expansion de la matrice mésangiale, et de l'apparition de vacuoles lipidiques au niveau des cellules tubulaires rénales. Au cours de ce mémoire, les objectifs expérimentaux ont consisté en l'analyse histologique et fonctionnelle des principaux organes touchés par l'obésité, à savoir, le tissu adipeux et le foie. En effet, au niveau de ces organes, des modifications structurelles ainsi que des troubles du métabolisme ont été observés. Par ailleurs, le développement de l'obésité peut mener à différentes perturbations liées à la dyslipidémie, l'inflammation, au stress oxydatif ou à la résistance à l'insuline.

Les résultats préalablement obtenus ont révélé un effet bénéfique de l'inhibition de la iNOS grâce à un inhibiteur spécifique, le L-NIL. Afin de mieux cerner le rôle du NO et des NOSs dans les différents processus étudiés, les tissus et le plasma de souris appartenant aux groupes LFD et HFD, traitées ou non à l'aide de L-NIL, ont été analysés. La première partie de ces résultats présente les différentes données métaboliques des souris après 16 semaines de régime alimentaire spécifique et d'un éventuel traitement au L-NIL, ainsi que la caractérisation de la dyslipidémie. La seconde partie permet de mettre en évidence les modifications structurelles et fonctionnelles caractérisant le tissu adipeux et le foie. La troisième partie concerne les conséquences systémiques de la pathologie, à savoir une résistance à l'insuline, une inflammation et le développement d'un stress oxydatif. Enfin, la dernière partie permet de comparer le niveau d'expression de la eNOS et de la iNOS en conditions normale et pathologique.

### 1. Variations du poids corporel, du poids du foie et des quantités d'eau et de nourriture ingérées chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL ainsi que les effets sur la dyslipidémie

#### 1.1 Effet d'un régime HFD sur les données métaboliques

**Table 2.** Données métaboliques des souris alimentées avec une nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL.

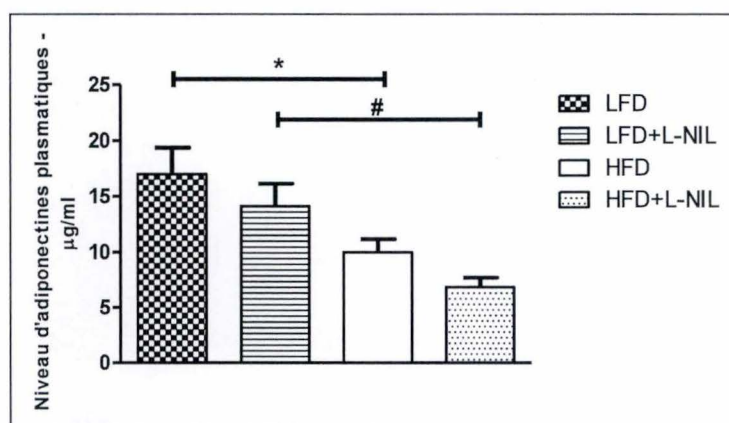
	LFD	LFD + L-Nil	HFD	HFD + L-Nil
<b>Augmentation relative du poids corporel (%)</b>	45,3 ± 2,0	50,3 ± 6,5	137,1 ± 6,0*#	113,0 ± 2,7*##
<b>Poids du foie (mg/mm de tibia)</b>	66,4 ± 4,3	59,7 ± 6,6	115,6 ± 23,4*#	141,5 ± 8,5*##
<b>Quantité d'eau ingérée (ml/24h)</b>	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2
<b>Quantité de nourriture ingérée (g/24h)</b>	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,0	5,3 ± 0,2	5,5 ± 0,0

Données mesurées dans les groupes expérimentaux suivants : LFD, LFD+L-NIL, HFD, HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes ± SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \*p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD, #p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et ##p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris HFD.

Sur base de ces résultats (Table 2), il a été démontré que nourrir des souris C57BL/6 avec de la nourriture HFD induisait une augmentation importante de la masse corporelle par comparaison avec les souris LFD. Le poids du foie après 16 semaines est également plus élevé chez les souris obèses, suggérant qu'un excès de lipides peut induire une hypertrophie de cet organe. Cependant, la quantité d'eau et de nourriture ingérées ne varie pas entre les souris HFD et LFD. Par ailleurs, le traitement au L-NIL semble prévenir l'augmentation du poids corporel mais pas l'hypertrophie hépatique chez les souris soumises au régime HFD.

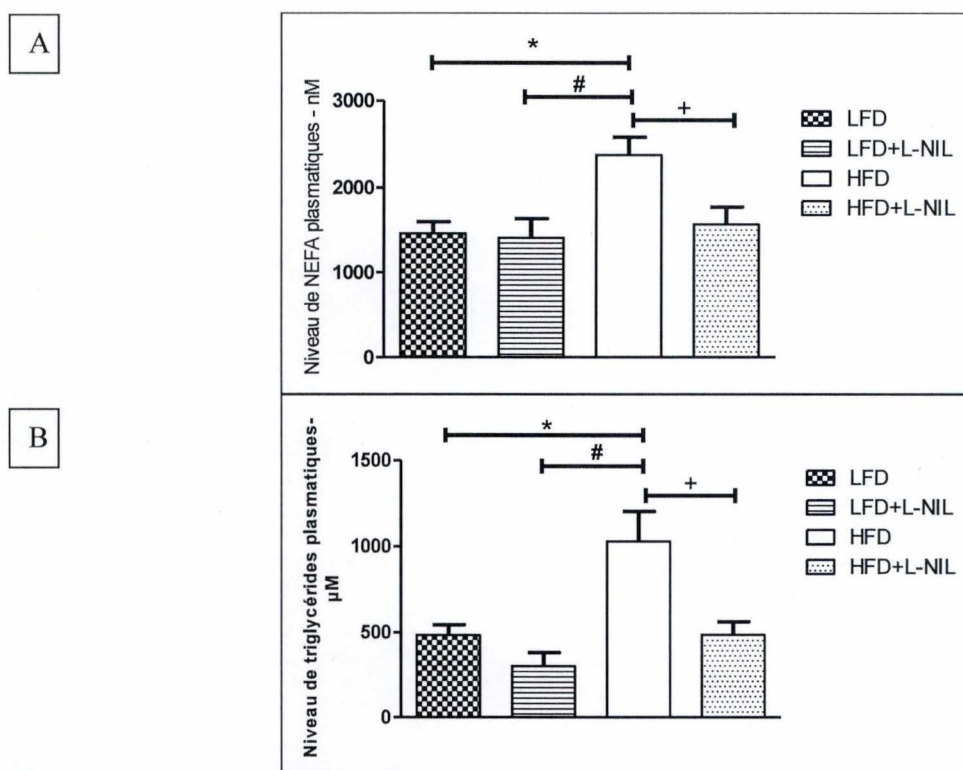
## 1.2 Effets d'un régime HFD sur les marqueurs sanguins

Il a été démontré que nourrir des souris C57BL/6 avec une nourriture HFD induisait une augmentation importante du poids corporel. De plus, il y aurait une conséquence sur les caractéristiques systémiques. En effet, la concentration d'adiponectine est très nettement diminuée chez les souris HFD en comparaison avec les LFD (**Figure 14**). Le traitement au L-NIL ne semble pas avoir d'effet sur cette variable. Concernant la concentration plasmatique en lipides, nous pouvons remarquer que la concentration de NEFA et de triglycérides plasmatiques est significativement plus élevée chez les souris HFD en comparaison avec les LFD (**Figure 15A et 15B respectivement**). Cette augmentation est réduite grâce au traitement au L-NIL.



**Figure 14 : Effet du régime riche en lipides (HFD) sur la concentration d'adiponectine plasmatique.** Analyse quantitative de la concentration d'adiponectine chez les souris nourries avec de la nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL.





**Figure 15 : Effet du régime riche en lipides sur la concentration de lipides plasmatiques.** Analyse quantitative de la concentration de triglycérides et de NEFA plasmatiques (A et B respectivement) chez les souris nourries avec de la nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et + $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris HFD.

## 2. Caractérisation histologique et fonctionnelle des principaux organes cibles de l'obésité

### 2.1 Caractérisations histologiques et adaptation fonctionnelle du tissu adipeux

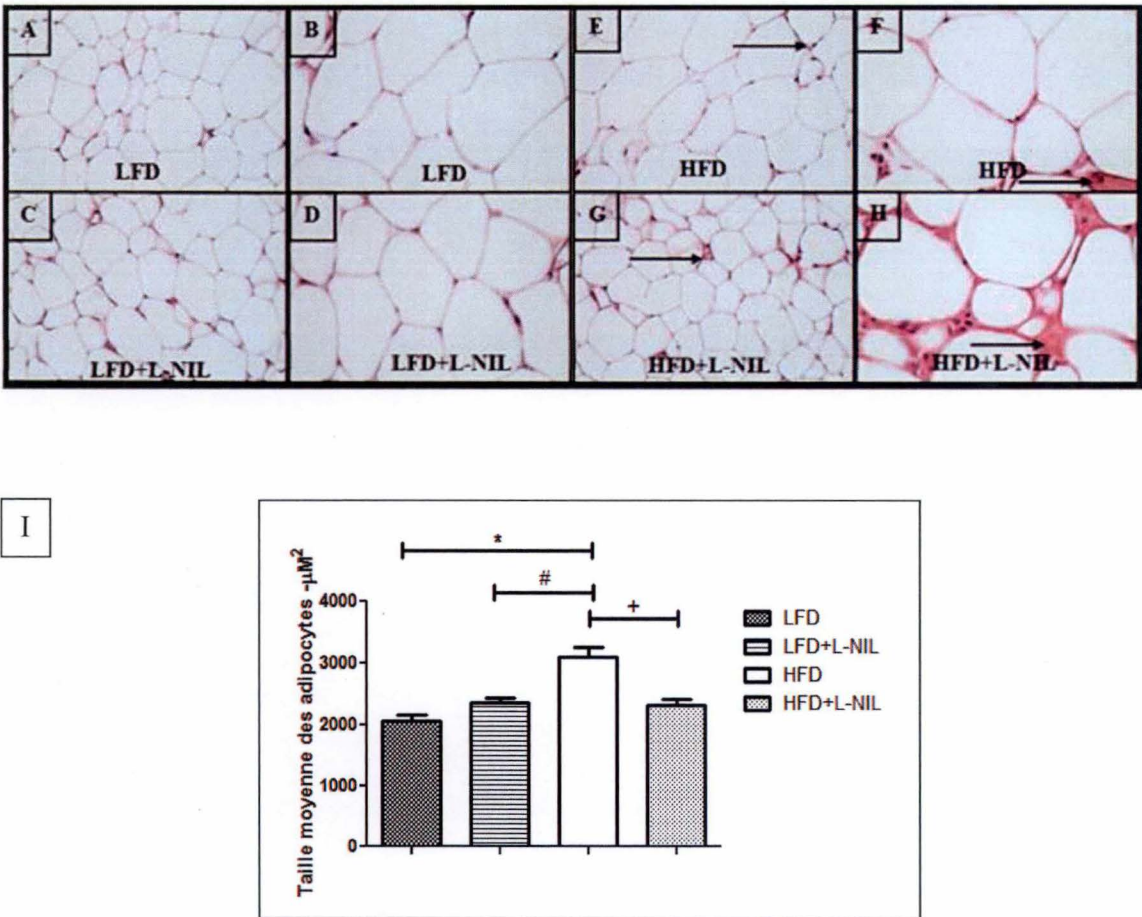
De façon à démontrer si un régime HFD peut induire des changements morphologiques dans le tissu adipeux péri-rénal, une coloration hématoxyline/éosine a été réalisée sur des coupes en paraffine de souris appartenant aux groupes expérimentaux LFD (**Figure 16A-B**), LFD+L-NIL (**Figure 16C-D**), HFD (**Figure 16E-F**) et HFD+L-NIL (**Figure 16G-H**). Les observations morphologiques révèlent que les souris HFD présentent un nombre plus faible d'adipocytes mais que ces cellules sont caractérisées par une taille plus importante en comparaison avec les souris HFD.

Pour confirmer ce changement histologique, la taille des adipocytes a été déterminée grâce à une méthode d'analyse d'image automatique basée sur l'analyse des photos d'adipocytes. Elle mesure la taille des cellules en  $\mu\text{m}^2$ . Cette analyse quantitative révèle une augmentation significative de la taille moyenne des adipocytes du groupe HFD ( $3107 \pm 162,5$

## RESULTATS

$\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.05$ ) en comparaison avec le groupe LFD ( $2057 \pm 116,1 \mu\text{m}^2$ ). De plus, le traitement au L-NIL prévient l'augmentation induite par un régime HFD ( $p < 0.05$ ) (**Figure 16I**).

Les observations morphologiques ont également montré une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire ainsi qu'un nombre plus élevé de cellules interstitielles chez les souris du groupe HFD. Cependant, ces changements ne sont pas améliorés par le traitement au L-NIL (**Figure 16G-H**).



**Figure 16 : Effet du régime riche en lipides sur l'histologie du tissu adipeux péri-rénal chez des souris nourries avec une nourriture LFD (A, 200x; B, 400x), LFD+L-NIL (C, 200x; D, 400x), HFD (E, 200x; F, 400x), and HFD+L-NIL (G, 200x; H, 400x).** Figure illustrant les caractéristiques histologiques grâce à une coloration hématoxyline et éosine du tissu adipeux chez des souris LFD (A-B), LFD+L-NIL (C-D), HFD (E-F) et HFD+L-NIL (G-H). Les flèches affichent une expansion de la matrice extracellulaire chez les groupes HFD et HFD + L-NIL. I : Analyse quantitative de la taille moyenne des adipocytes à la semaine 16 ( $n = 6-8$  par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et + $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris HFD.

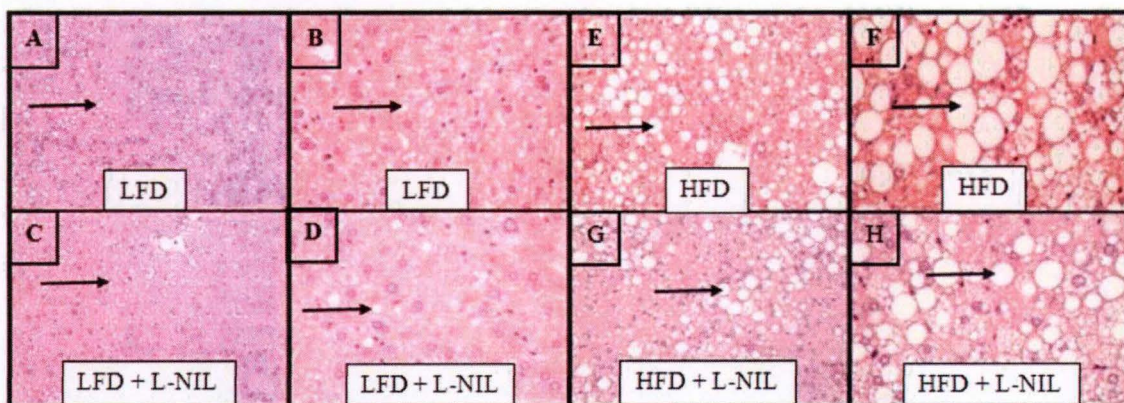
### 2.2 Caractérisations histologiques et adaptation fonctionnelle du foie

De façon à évaluer dans quelle mesure un régime HFD peut induire des changements morphologiques dans le foie, nous avons réalisé une coloration hématoxyline et éosine sur des coupes en paraffine (**Figure 17A-D**) chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL.



## RESULTATS

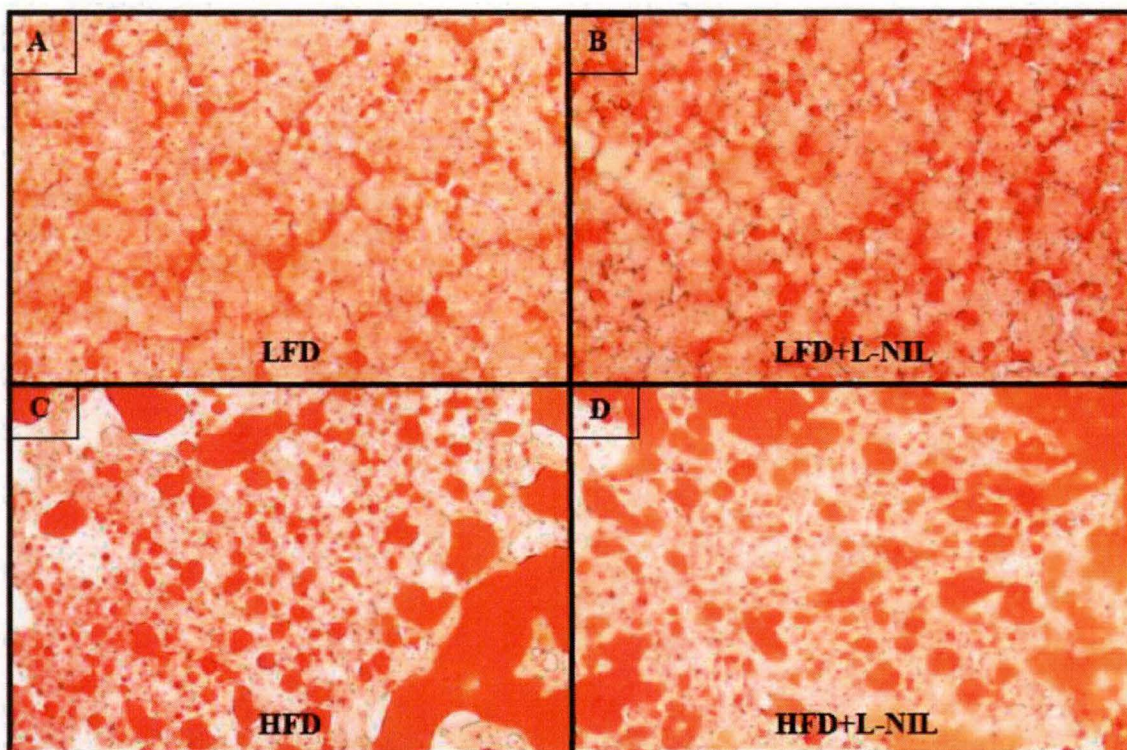
Comme illustré sur la **Figure 17**, l'analyse morphologique du foie révèle que les souris nourries avec une nourriture HFD développent une augmentation significative de la taille des vacuoles au niveau des hépatocytes à la semaine 16 (**Figure 17E-F**). Cependant, le traitement au L-NIL ne semble pas moduler cette augmentation de taille cellulaire (**Figure 17G-H**). Les vacuoles présentes dans les cellules sont aussi larges que le noyau ou parfois même plus grosses. Comme illustré sur les **Figure 17E-H**, beaucoup de cellules semblent être complètement remplies de ces vacuoles et le traitement au L-NIL ne semble pas diminuer leur nombre.



**Figure 17** : Effet du régime riche en lipides sur l'histologie du foie chez des souris nourries avec une nourriture LFD (A, 200x; B, 400x), LFD+L-NIL (C, 200x; D, 400x), HFD (E, 200x; F, 400x), and HFD+L-NIL (G, 200x; H, 400x). Figure illustrant les caractéristiques histologiques grâce à une coloration hématoxyline et éosine du foie chez des souris LFD (A-B), LFD+L-NIL (C-D), HFD (E-F) et HFD+L-NIL (G-H). Les flèches montrent une vacuole sur chaque image.

Pour mieux caractériser la constitution des vacuoles observées au niveau des hépatocytes, nous avons réalisé une autre analyse morphologique grâce à la coloration Oil Red O. Cette coloration a été effectuée sur des coupes congelées de foie des groupes LFD (**Figure 18A**), LFD+L-NIL (**Figure 18B**), HFD (**Figure 18C**) et HFD+L-NIL (**Figure 18D**). Cela nous a permis d'identifier l'accumulation de lipides neutres marqués en rouge dans la cellule. Nous avons observé une augmentation marquée de vacuoles positives pour l'Oil Red O dans les hépatocytes du groupe HFD (**Figure 18C**) en comparaison avec les LFD et LFD+L-NIL (**Figure 18A and B, respectively**). Cependant, comme illustré sur la **Figure 18D**, le traitement avec du L-NIL ne semble pas prévoir cette accumulation de lipides dans les hépatocytes.



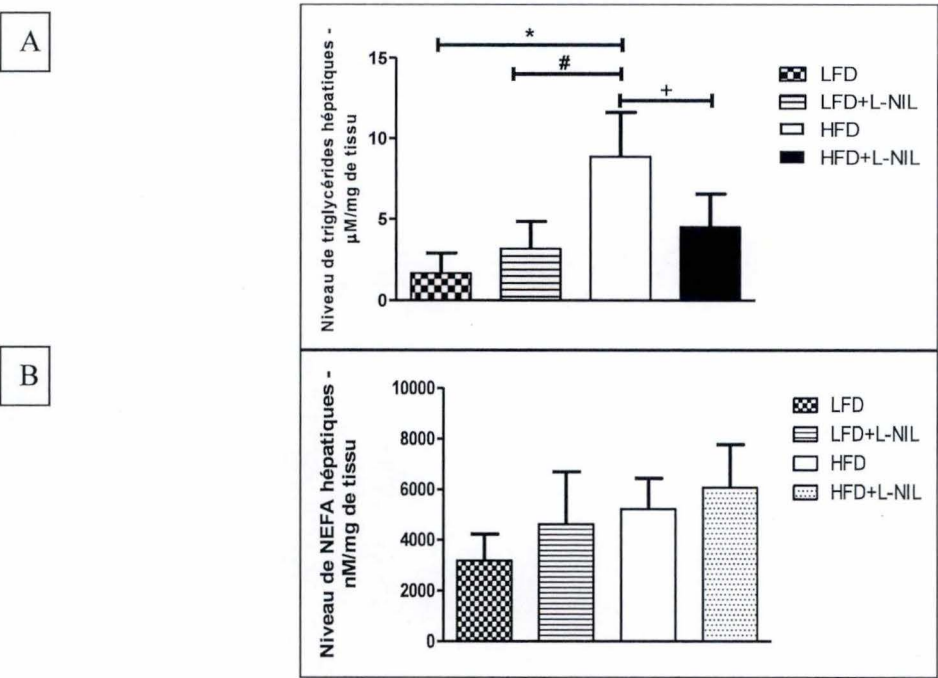


**Figure 18 :** Effet du régime riche en lipides sur l'histologie du foie chez des souris nourries avec une nourriture LFD (A, 200x), LFD+L-NIL (B, 200x), HFD (C, 200x), and HFD+L-NIL (D, 200x). Figure illustrant les caractéristiques histologiques au niveau du foie grâce à une coloration oil red O réalisée sur des coupes de tissus OCT.

De façon à démontrer un effet du régime HFD sur le stockage des lipides au niveau du foie, nous avons mesuré la concentration de triglycérides et d'acide gras dans ce tissu exprimée par mg de tissu (**Figure 19A-B, respectivement**). Une augmentation significative de la concentration de triglycérides a été observée dans le groupe HFD comparé au groupe LFD. Cette augmentation était significativement atténuée dans le groupe traité au L-NIL (**Figure 19A**).

Ensuite, la concentration de NEFA a également été mesurée dans le foie (**Figure 19B**). Nous avons observé une augmentation de la concentration de ces acides gras chez les souris du groupe HFD en comparaison avec le groupe LFD. Cependant, cette différence n'était pas significative. De plus, le traitement au L-NIL chez les souris HFD ne semble pas prévenir cette augmentation.





**Figure 19 : Effet du régime riche en lipides sur l'accumulation des lipides au niveau du foie.** Analyse quantitative du niveau de triglycérides et de NEFA hépatiques (A et B respectivement) chez les souris nourries avec de la nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et + $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris HFD.

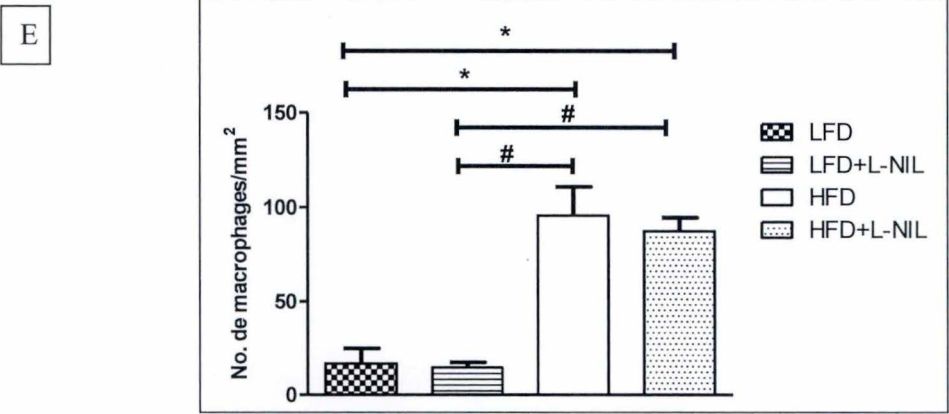
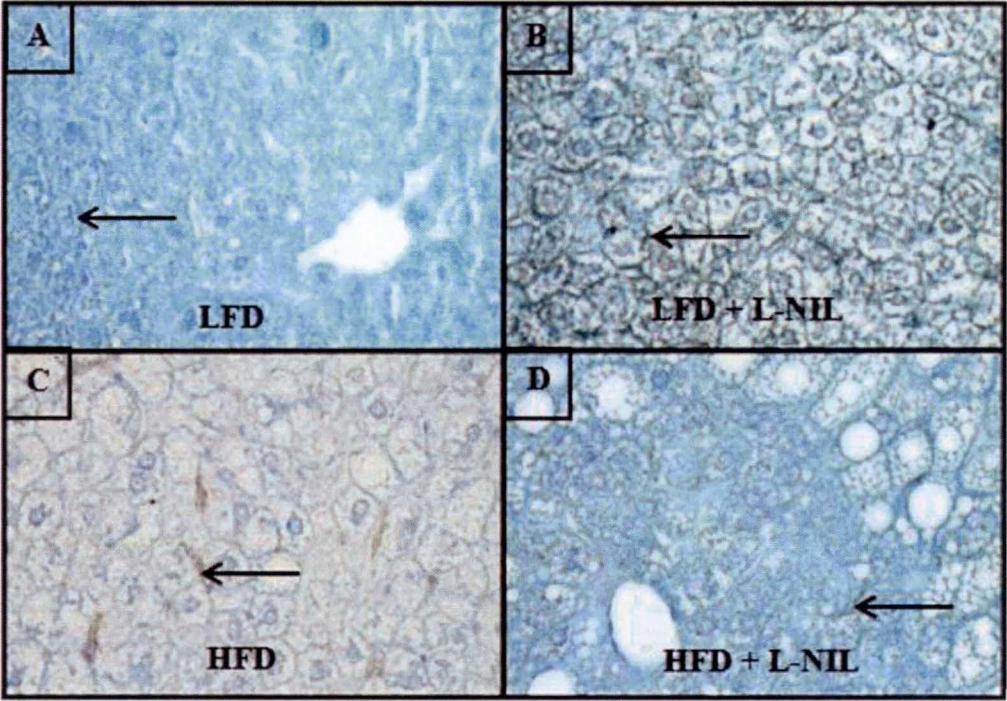
### 3. Conséquences de l'obésité : inflammation, résistance à l'insuline et stress oxydatifs

#### 3.1 Effets d'un régime HFD sur l'inflammation du tissu adipeux et du foie

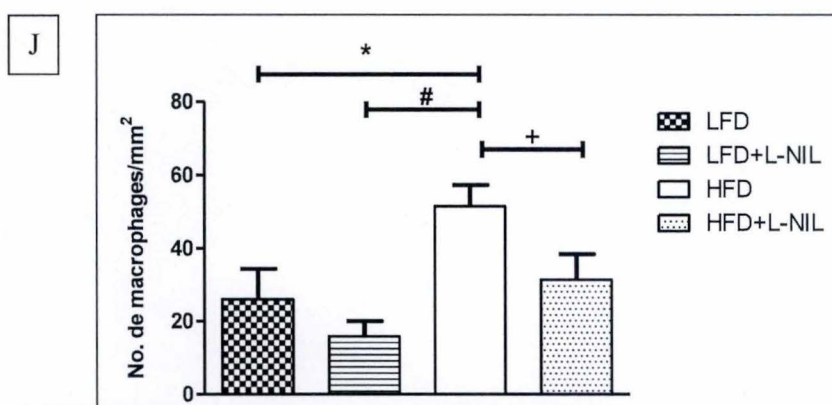
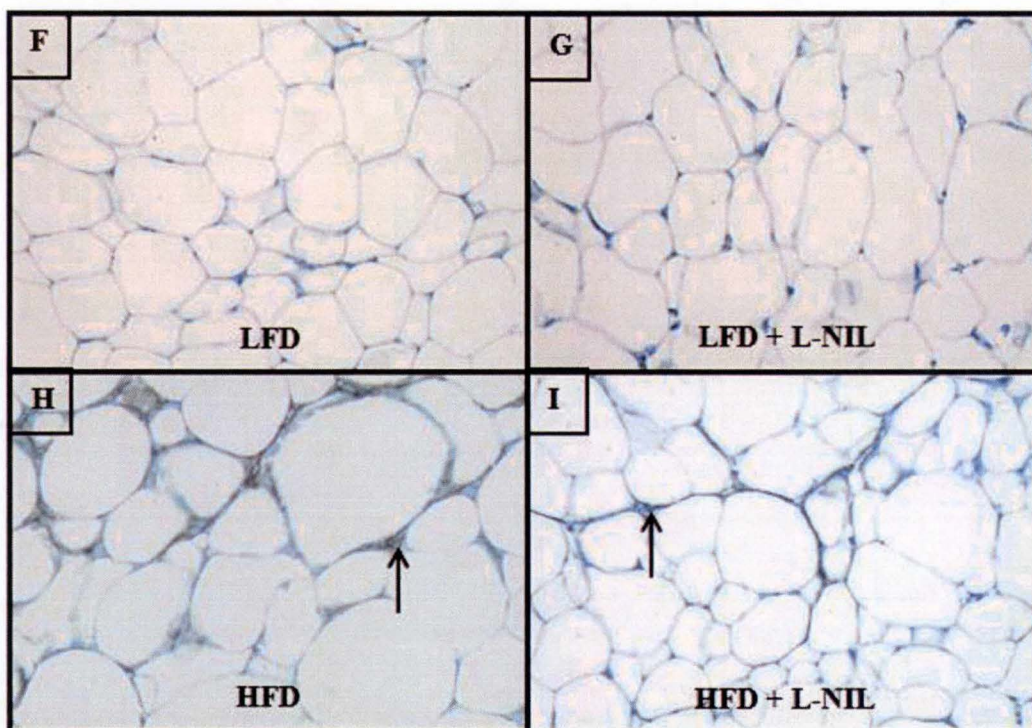
Afin d'identifier une réponse inflammatoire du foie et du tissu adipeux, nous avons réalisé une analyse immunohistochimique permettant de quantifier la présence des macrophages dans le foie (**Figure 20A-E**) et dans le tissu adipeux péri-rénal (**Figure 20F-J**). Dans les deux organes, une augmentation significative de la quantité de macrophages a été observée chez les souris du groupe HFD par comparaison à celles du groupe LFD (**Figure 20C, E, H et I**). De plus, cette augmentation peut être prévenue par le traitement au L-NIL au niveau du foie mais pas du tissu adipeux péri-rénal. Une analyse complémentaire a également été effectuée, afin de mesurer la quantité relative de transcrit de MCP-1 dans des homogénats de foie et de tissu adipeux. Ceci a été réalisé grâce à une qPCR de façon à mettre en évidence l'augmentation de l'expression d'ARNm pour chaque groupe en fonction du niveau d'expression d'ARNm des LFD. Les résultats obtenus révèlent une augmentation significative chez les souris HFD par comparaison aux souris LFD tant dans le foie que dans le tissu adipeux (**Figure 21A et C respectivement**). Cependant, un effet du L-NIL ne serait observé qu'au niveau hépatique. Finalement, pour mettre en évidence la quantité de la protéine MCP-1, un

RESULTATS

dosage a été réalisé et celui-ci a montré une augmentation de la concentration de MCP-1 chez les souris HFD par comparaison aux souris LFD, tant dans le foie que dans le tissu adipeux (**Figure 21B et 21D**). Le traitement au L-NIL ne semble pas améliorer l'inflammation au niveau du foie. Cependant, un effet au niveau du tissu adipeux des souris HFD+L-NIL a été observé.

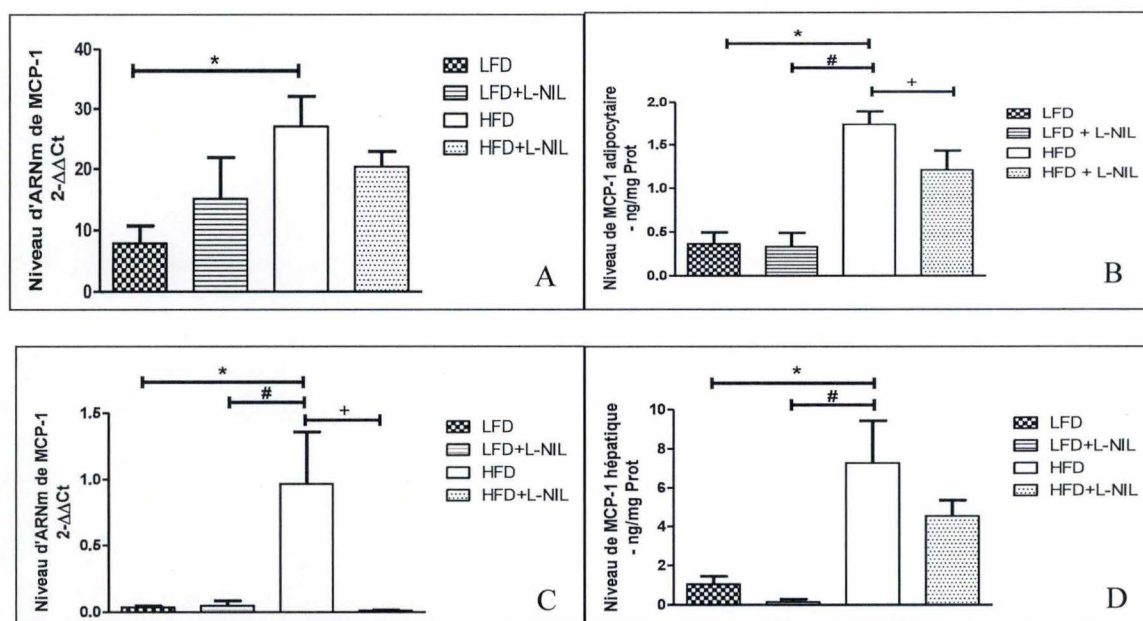






**Figure 20 : Effet du régime riche en lipides sur l'inflammation.** Figure illustrant une IHC permettant de révéler la présence de macrophages (x400) au niveau du foie (A, B, C, D) et du tissu adipeux (F, G, H, I) chez des souris nourries avec de la nourriture LFD (A-F), LFD+L-NIL (B-G), HFD (C-H) et HFD+L-NIL (D-I) à la semaine 16. N= 6-8 par groupe. Les flèches montrent un macrophage sur chaque image.

E et J : Analyse quantitative du nombre de macrophages par mm<sup>2</sup> de tissu chez des souris nourries avec de la nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL dans le foie et le tissu adipeux (E et I respectivement) (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes ± SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \*p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD, #p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et +p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris HFD.

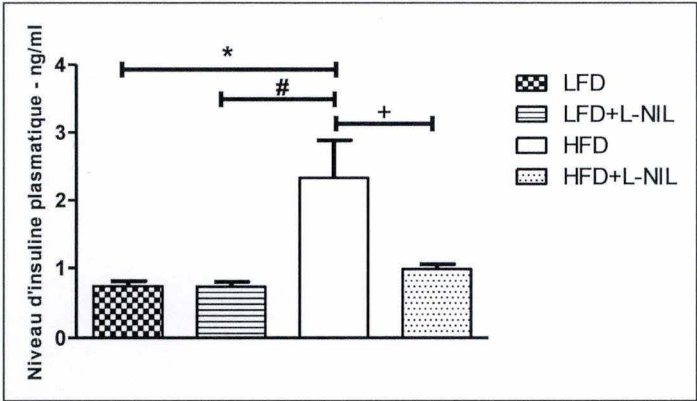


**Figure 21 : Effet du régime riche en lipides sur l'inflammation.** Quantité d'ARN messager adipocytaire (A) et hépatique (C) + quantité de la protéine MCP-1 au niveau du tissu adipeux (B) et du foie (D) chez des souris nourries avec de la nourriture LFD, LFD+L-NIL, HFD et HFD+L-NIL à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes ± SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \*p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD, #p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et +p ≤ 0.05 en comparaison avec les souris HFD.

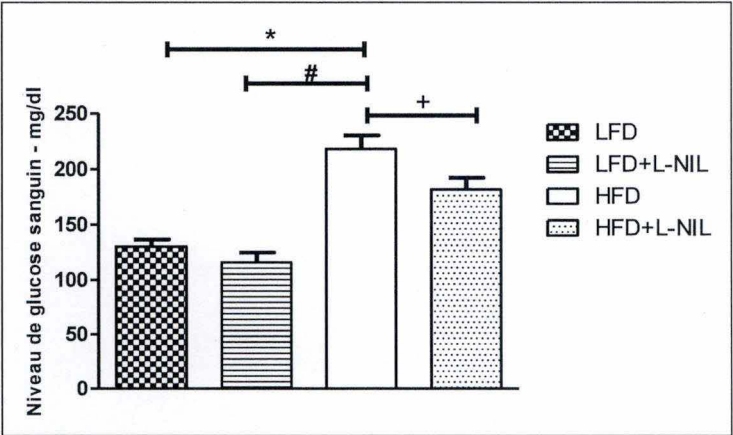
### 3.2 Effets d'un régime HFD sur la résistance à l'insuline

Pour évaluer une éventuelle résistance à l'insuline se produisant chez les souris HFD, les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose ont été mesurées. Comme illustré sur la **Figure 22**, la concentration plasmatique d'insuline était significativement supérieure chez les souris HFD en comparaison avec les groupes LFD et LFD+L-NIL. Cette augmentation de la concentration plasmatique d'insuline est presque rétablie grâce au traitement au L-NIL, suggérant que le L-NIL pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline (**Figure 22**). Concernant la glycémie, la même tendance est observée (**Figure 23**). Le groupe HFD affiche une augmentation de la concentration plasmatique de glucose en comparaison avec le groupe LFD. De même que pour l'insuline, le L-NIL semble prévenir l'hyperglycémie. Ces résultats suggèrent qu'un régime riche en lipides pourrait déterminer le développement d'une résistance à l'insuline dans nos conditions expérimentales.





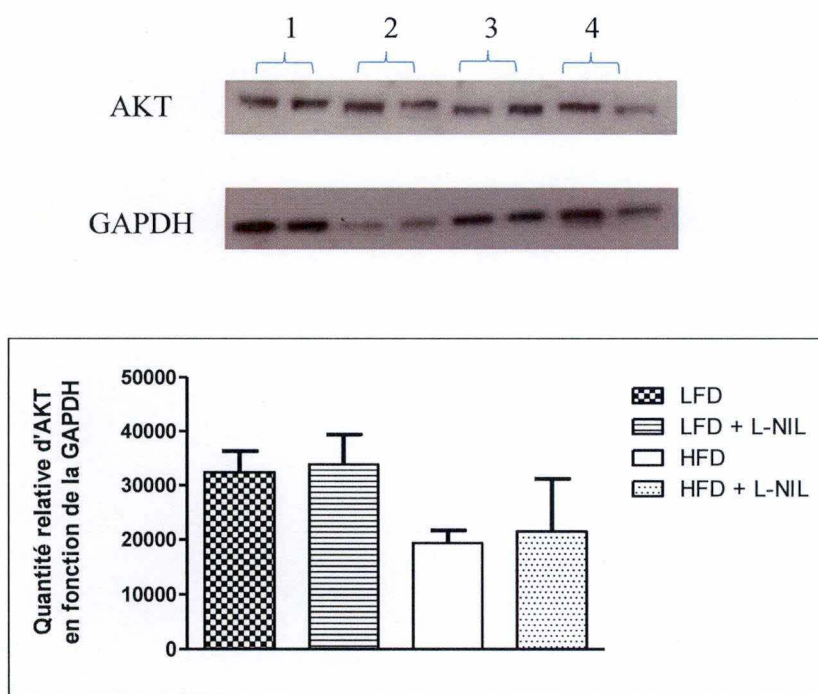
**Figure 22 : Concentration plasmatique d'insuline.** Analyse quantitative de la concentration plasmatique d'insuline chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et + $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris HFD.



**Figure 23 : Concentration plasmatique de glucose.** Analyse quantitative de la concentration plasmatique de glucose chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL, et + $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris HFD.

## RESULTATS

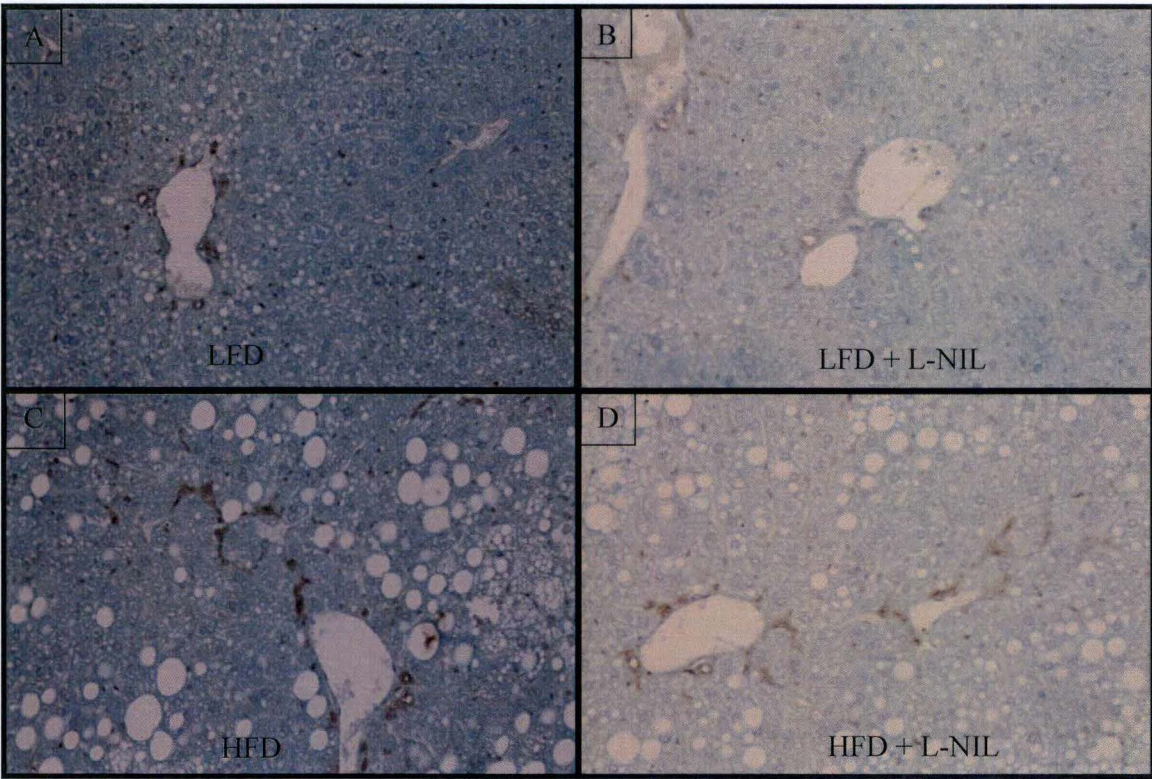
De façon à mettre en évidence un trouble de la voie de signalisation de l'insuline, nous avons réalisé un Western Blot de la protéine AKT au niveau du foie (**Figure 24**). Nous avons observé une diminution de la densitométrie de cette protéine chez les HFD en comparaison avec les LFD. Le traitement au L-NIL, ne semble pas avoir d'effets sur la molécule.



**Figure 24 : Densitométrie de la protéine AKT.** Analyse quantitative de la protéine AKT hépatique chez des souris LFD (1), LFD+L-NIL (2), HFD (3) and HFD+L-NIL (4) en fonction de la GAPDH (n= 2 par groupe). Résultats : moyennes ± SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls .

Ensuite, nous avons également réalisé une analyse par immunohistochimie d'IRS-1 au niveau du foie de souris LFD, LFD + L-NIL, HFD et HFD + L-NIL (**Figure 25**). De façon qualitative, on remarque un marquage plus prononcé pour les HFD (**Figure 25C**) et HFD + L-NIL (**Figure 25D**) que pour les LFD (**Figure 25A**) et LFD + L-NIL (**Figure 25B**). De plus, il ne semble pas y avoir de différence de marquage après utilisation du traitement. Si l'on regarde l'endroit du marquage que les vaisseaux et les hépatocytes sont marqués.

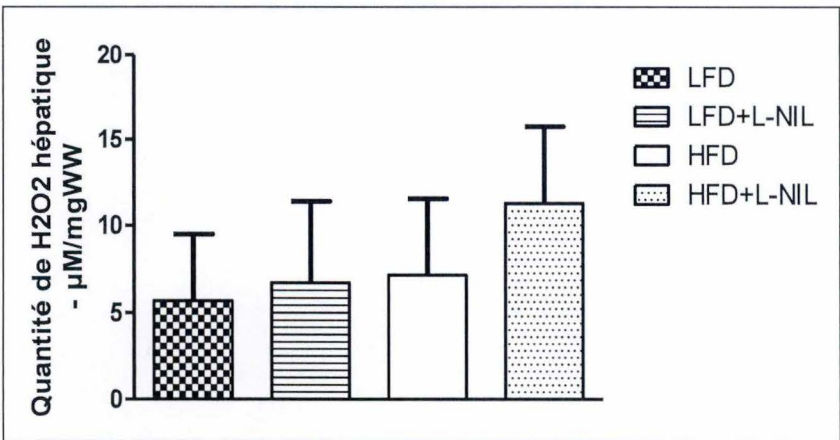




**Figure 25 : Effet du régime riche en lipides sur la résistance à l'insuline.** Figure illustrant une IHC mettant en avant l'IRS-1 au niveau du foie (A, B, C, D (200X)) de souris nourries avec de la nourriture LFD (A), LFD+L-NIL (B), HFD (C) et HFD+L-NIL (D) à la semaine 16. (n= 6-8 par groupe).

### 3.3 Effets d'un régime HFD sur le stress oxydatif/nitrosatif

Afin de mettre en évidence un stress oxydatif, un dosage de  $H_2O_2$  dans la phase méthanol obtenue grâce au triphase du foie a été réalisé (**Figure 26**). On ne remarque pas de différence nette entre les groupes expérimentaux en ce qui concerne la concentration de  $H_2O_2$ . Le traitement au L-NIL ne semble pas diminuer le stress oxydatif mais semble au contraire, l'augmenter. Cependant, aucune de ces données n'est significative ( $p \leq 0.05$ ).

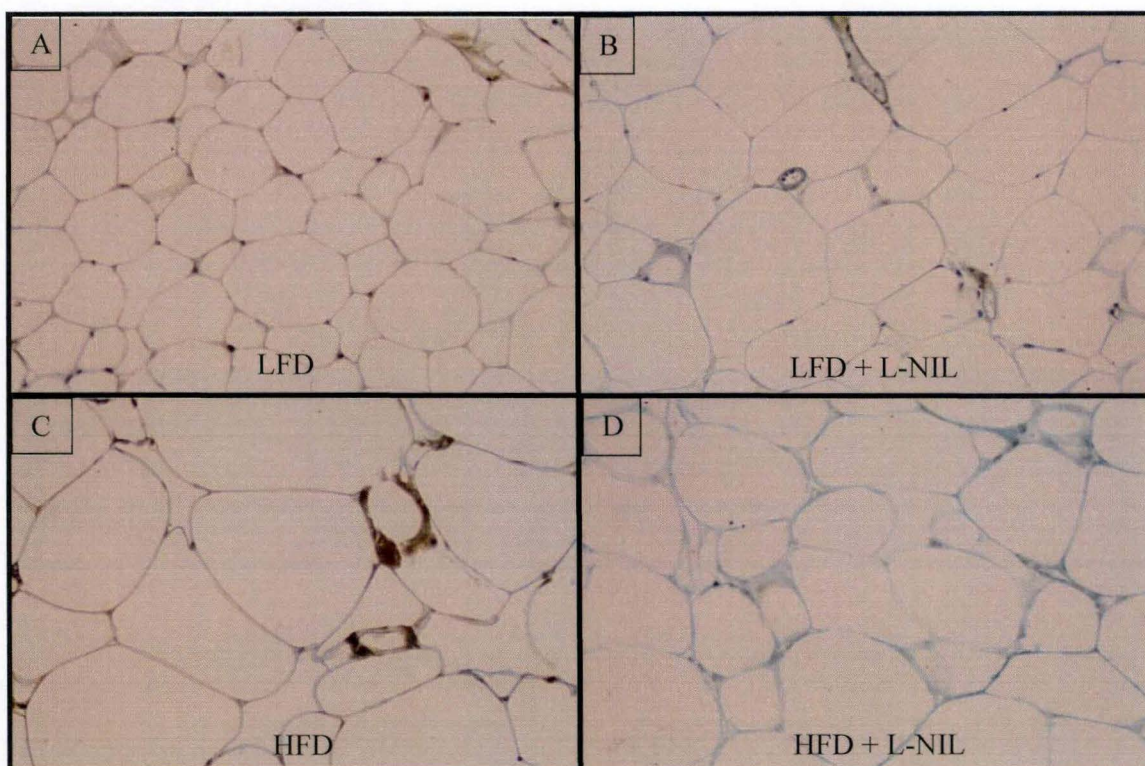


**Figure 26 : Evaluation du stress oxydatif.** Analyse quantitative du niveau de peroxyde d'hydrogène chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls.



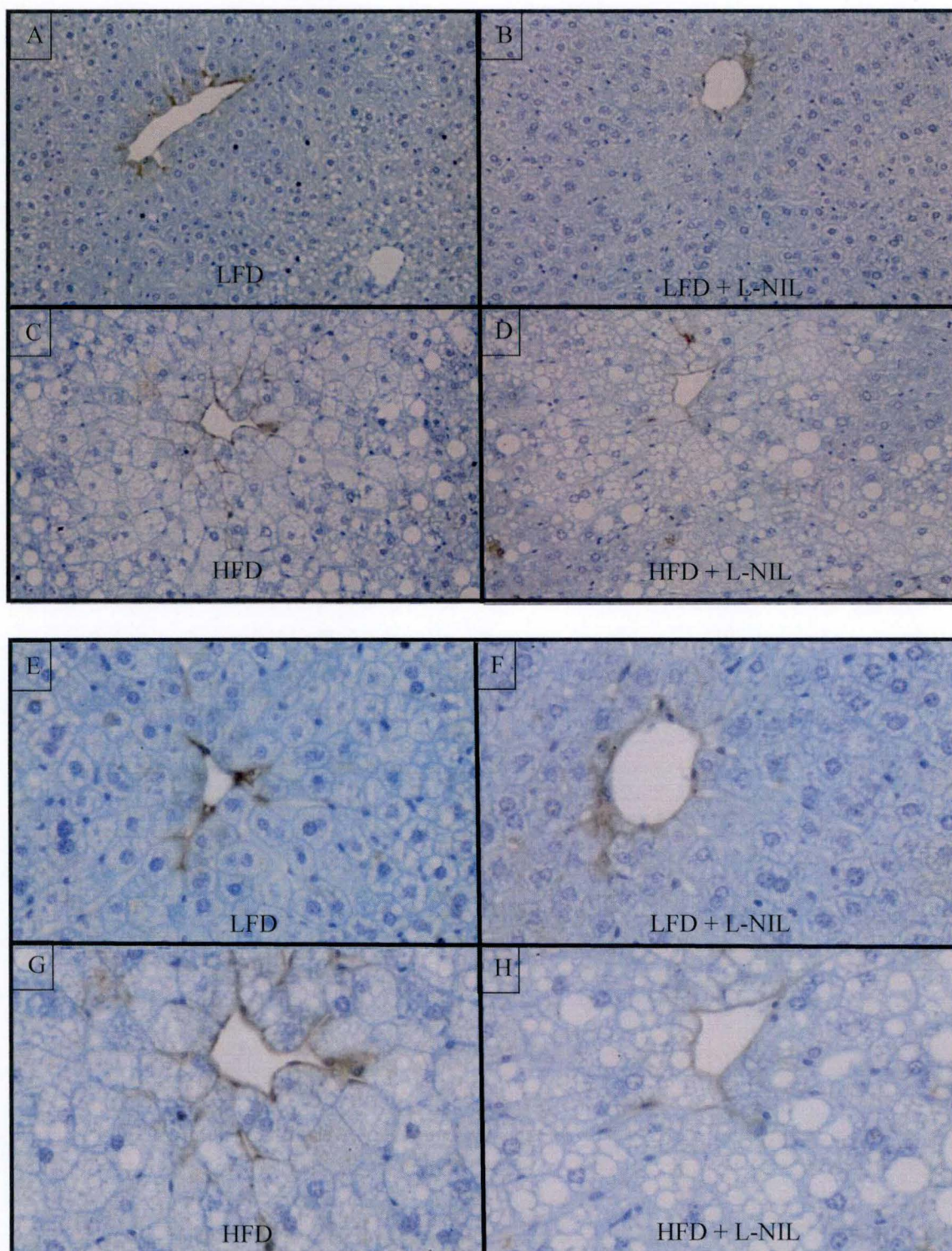
## RESULTATS

Afin de mettre en évidence un stress nitrosatif chez les souris HFD, une immunohistochimie permettant de marquer la nitrotyrosine a été réalisée au niveau du tissu adipeux (**Figure 27**) et du foie (**Figure 28**). Il semblerait qu'au niveau du tissu adipeux, il y ait plus de marquage chez les souris du groupe HFD en comparaison avec celles du groupe LFD (**Figure 27 A et C**). De plus, la coloration apparaît moins marquée après le traitement au L-NIL (**Figure 27 B et D**). Concernant le foie, la même tendance est observée puisque l'on remarque une coloration plus intense chez les HFD que chez les LFD (**Figure 28A, C, E, G**). Le traitement au L-NIL semble également atténuer cette coloration (**Figure 28B, D, F, H**). Finalement, on remarque que la coloration est surtout présente au niveau des vaisseaux sanguins.



**Figure 27 : Effets du régime riche en lipides sur le stress oxydatif.** Figure illustrant une IHC permettant de marquer la nitrotyrosine au niveau du tissu adipeux (I, J, K, L (200X)) de souris nourries avec de la nourriture LFD (A), LFD+L-NIL (B), HFD (C) et HFD+L-NIL (D) à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe).



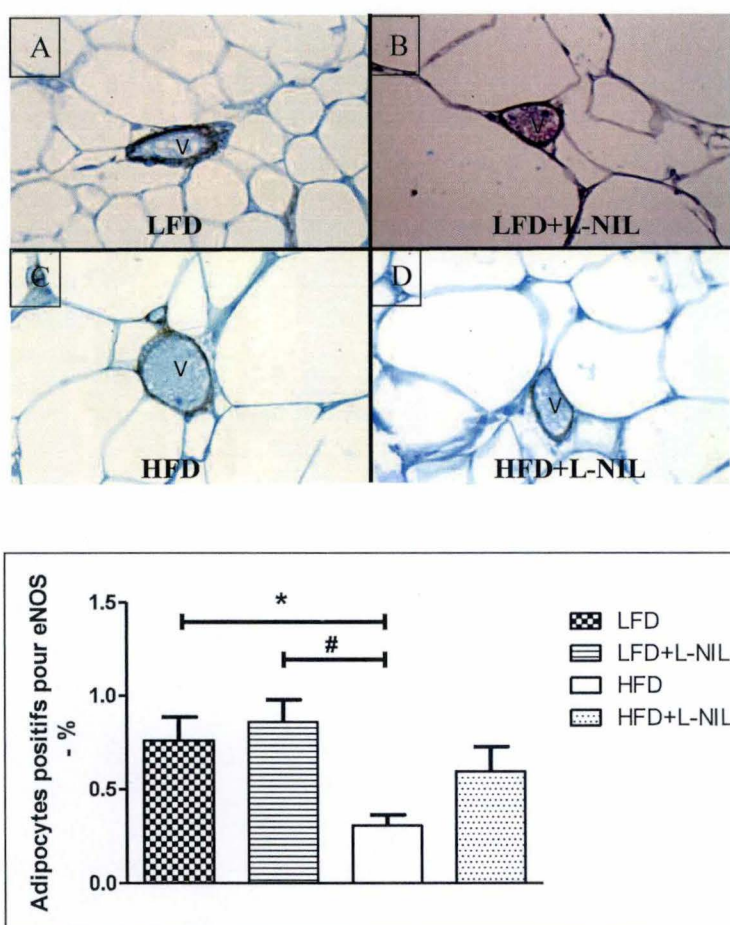


**Figure 28 : Effet du régime riche en lipide sur le stress oxydatif.** Figure illustrant une IHC permettant de marquer la nitrotyrosine au niveau du foie (A, B, C, D (200X) E, F, G, H (400X)) de souris nourries avec de la nourriture LFD (A-E), LFD+L-NIL (B-F), HFD (C-G) et HFD+L-NIL (D-H) à la semaine 16 (n= 6-8 par groupe).



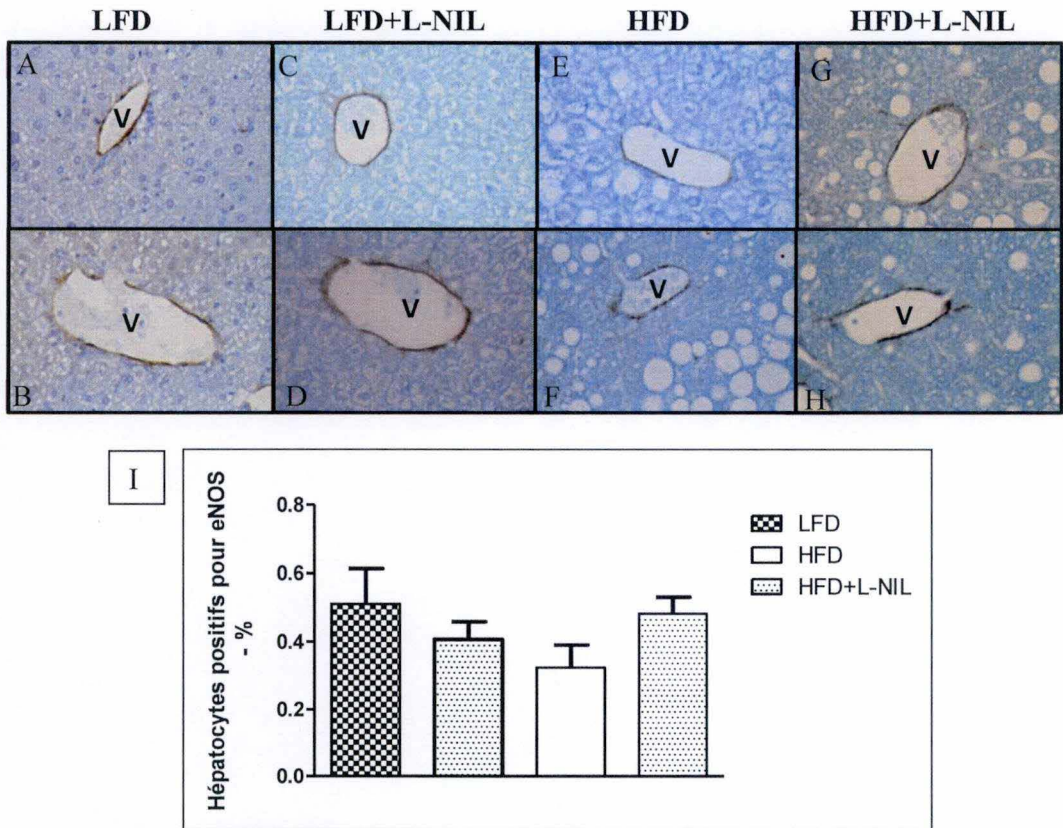
#### 4. Etude de l'enzyme eNOS durant l'obésité

Afin d'identifier l'expression de la eNOS, une immunohistochimie a été réalisée sur des coupes en paraffine de tissu adipeux péri-rénal (**Figure 29A-E**) et de foie (**Figure 30A-I**) de souris appartenant aux groupes LFD (**Figure 29A et 30A-B**), LFD+L-NIL (**Figure 29B et 30C-D**), HFD (**Figure 29C et 30E-F**) et HFD+L-NIL (**Figure 29D et 30G-H**). La eNOS est une enzyme exprimée par les cellules endothéliales. Il n'est donc pas surprenant de retrouver le marquage de la eNOS au niveau des vaisseaux sanguins dans les deux organes. La quantification de ce marquage positif pour la eNOS au niveau du tissu adipeux a montré une différence significative dans l'expression de l'enzyme (**Figure 14 E**). En effet, une diminution marquée de ce marquage de la eNOS a été observée dans le groupe HFD en comparaison avec le groupe LFD. Concernant le foie, il n'y avait pas de différence significative de l'expression de l'enzyme entre ces deux groupes, bien qu'une diminution semble être observée dans le groupe HFD (**Figure 30I**). Le traitement au L-NIL ne prévient pas complètement cette diminution.



**Figure 29: Effet du régime riche en lipides sur l'expression de la eNOS au niveau du tissu adipeux.** Figure montrant une IHC permettant de marquer la eNOS au niveau du tissu adipeux (x400) chez des souris nourries avec une nourriture LFD (A-B), LFD+L-NIL (C-D), HFD (E-F) et HFD+L-NIL (G-H). I : Analyse quantitative des adipocytes positifs pour la eNOS en % chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls : \* $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD, # $p \leq 0.05$  en comparaison avec les souris LFD+L-NIL.





**Figure 30 : Effets du régime riche en lipides sur l'expression de eNOS au niveau du foie.** Figure montrant une IHC permettant de marquer la eNOS au niveau du foie (x400) chez des souris nourries avec une nourriture LFD (A-B), LFD+L-NIL (C-D), HFD (E-F) et HFD+L-NIL (G-H). V= vaisseau sanguin I : Analyse quantitative des cellules hépatiques positives pour la eNOS en % chez des souris LFD, LFD+L-NIL, HFD and HFD+L-NIL (n= 6-8 par groupe). Résultats : moyennes  $\pm$  SEM. Analyses statistiques : one-way ANOVA suivie par un test de Newman-Keuls.

**DISCUSSION GÉNÉRALE,  
CONCLUSION &  
PERSPECTIVES**



La prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique en général a augmenté ces 20 dernières années, principalement dans les pays occidentaux. Ce syndrome est un problème de santé publique mais également un fardeau économique pour les gouvernements responsables de la prise en charge des personnes obèses. Pour rappel, l'obésité est une maladie complexe et multifactorielle qui est la conséquence d'une alimentation riche en sucres et en lipides ainsi que d'une sédentarité accrue. Le tissu adipeux a pour fonction de stocker les acides gras sous forme de triglycérides (TG). Lorsque la concentration plasmatique de ces lipides augmente, il en résulte un stockage accru. Deux conséquences caractérisent ce processus. D'une part, la taille des adipocytes augmente et limite la possibilité de stocker davantage d'acides gras. Cela provoque une accumulation ectopique au niveau de différents organes périphériques. D'autre part, la sécrétion d'adipokines par les adipocytes est stimulée, ce qui va mener à terme au développement d'une réponse inflammatoire, de stress oxydatifs et de la résistance à l'insuline (Guilherme *et al.*, 2008). En conséquence, l'obésité représente un important facteur de risque d'autres pathologies comme la stéatose hépatique, le diabète ou l'hypertension.

Sur base de ces considérations, le premier objectif de ce mémoire était de mettre en évidence les modifications structurelles et fonctionnelles du tissu adipeux et du foie ainsi que de caractériser la résistance à l'insuline, l'inflammation et les stress oxydatifs. Par ailleurs, dans l'optique du développement de nouvelles approches thérapeutiques, il serait intéressant de disposer de traitements permettant de réduire les altérations métaboliques liées à cette maladie. C'est pour cette raison que le second objectif de ce mémoire était d'évaluer les effets bénéfiques potentiels du L-NIL, un inhibiteur spécifique de la iNOS.

## **1. Atteintes systémiques suite à un régime riche en graisse (HFD) chez la souris C57BL/6**

---

Dans nos conditions expérimentales, les résultats ont montré qu'un régime HFD induisait une augmentation significative du poids corporel après 16 semaines chez des souris C57BL/6J, ce qui correspond à l'adiposité viscérale observée en cas de syndrome métabolique. En effet, une augmentation très marquée de la masse de tissu adipeux viscéral et péri-rénal a été mesurée chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. La souche de souris C57BL/6J se révèle être appropriée dans le contexte de notre étude car elle répond de façon significative à une augmentation de l'apport alimentaire de lipides menant à l'obésité (West *et al.*, 1992 ; Rossmeis *et al.*, 2003). Nos résultats montrent également que les quantités d'eau et de nourriture ingérées ne variaient pas durant les 16 semaines et ce, dans les différents groupes, ce qui démontre donc que c'est l'apport accru de lipides dans l'alimentation, et non la quantité de nourriture ingérée, qui serait à l'origine de l'obésité. En effet, plusieurs études ont rapporté qu'une augmentation importante de lipides alimentaires (saturés ou insaturés) induirait une réponse pro-inflammatoire dans des modèles *in vitro* et *in vivo* et pourrait mener au développement d'une résistance à l'insuline (Montell *et al.*, 2001 ; Chavez et Summer, 2003 ; Alvheim *et al.*, 2013 ; Teng *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les caractéristiques systémiques, nous avons observé une diminution de la concentration plasmatique de l'adiponectine, associée à une diminution des concentrations de NEFA et à une augmentation de celle des TG chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Pour rappel, l'adiponectine est sécrétée par le tissu adipeux et présente des effets anti-inflammatoires, améliore la sensibilité à l'insuline et permet la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie et les muscles (Hajer *et al.*, 2008 ; Tilg et Moschen, 2010). Une diminution de la



sécrétion de cette hormone est observée en cas d'obésité. Bien que l'origine de cette réponse ne soit pas claire, l'inflammation a été proposée comme inhibiteur de l'expression de l'adiponectine, notamment par le biais du TNF- $\alpha$ . Cependant, cette hypothèse a été assez controversée étant donné que la diminution de la sécrétion d'adiponectine n'était pas observée dans d'autres maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, le diabète de type 1 ou la fibrose cystique (Hosogai *et al.*, 2007 ; Ye *et al.*, 2007 ; Fantuzzi, 2008). Différentes études favorisent plutôt un lien avec l'hypoxie du tissu adipeux. En effet, un niveau élevé d'hypoxie au niveau des adipocytes, induit une diminution de l'expression d'ARNm codant pour l'adiponectine dans des adipocytes en culture (Chen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007). De plus, Ye *et al.* mettent en évidence que la diminution de la pression partielle en O<sub>2</sub> au niveau des vaisseaux du tissu adipeux de souris ob/ob induit une diminution de la sécrétion de l'adiponectine et qu'une perte de poids permettrait d'améliorer l'oxygénation du tissu adipeux (Ye *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que la réduction de la sécrétion d'adiponectine pourrait survenir avant que ne se manifestent le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline (Hotta *et al.*, 2001). La diminution du facteur de transcription PPAR- $\gamma$  pourrait être à l'origine de la diminution de sécrétion de l'adiponectine. En effet, l'utilisation de rosiglitazone, un agoniste de ce facteur de transcription, permettrait une augmentation de l'adiponectine chez des souris déficientes pour les récepteurs à la leptine et au LDL (Hulsmans *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration sanguine de NEFA et de TG indique une dyslipidémie. En effet, comme expliqué précédemment, le tissu adipeux présente une altération fonctionnelle, se caractérisant par un déséquilibre entre la libération d'acide gras dans la circulation (qui augmente) et leur  $\beta$ -oxydation (qui diminue). Le tissu adipeux n'étant plus capable de stocker l'excès d'acide gras, ceux-ci se retrouvent dans le compartiment vasculaire. De plus, une augmentation de l'activité de HSL (lipase hormono-sensible), résultant de la résistance à l'insuline, permet une libération plus importante d'acides gras dans le sang (Guilherme *et al.*, 2008 ; Mitrou *et al.*, 2010). *In vivo*, le taux plasmatique d'acides gras libres est plus élevé chez les sujets obèses que chez les sujets sains (Horowitz *et al.*, 1999). En ce qui concerne l'évolution de la concentration plasmatique des TG, elle serait le résultat d'une diminution de l'activité de l'enzyme LPL qui ne serait plus stimulée par l'insuline (Rossmeisl *et al.*, 2003 ; Mitrou *et al.*, 2010).

Enfin, nous avons mesuré la concentration plasmatique de l'insuline afin de mettre en évidence une éventuelle résistance à l'insuline. Le rôle de cette hormone est de stimuler le foie à stocker le glucose sous forme de glycogène et de diminuer la glycogénèse hépatique. Au niveau du tissu adipeux et des muscles, elle permet à ces organes de capter le glucose. Il est donc logique que la concentration d'insuline plasmatique augmente en cas de résistance à l'insuline puisque celle-ci est toujours synthétisée par le pancréas mais n'est pas utilisée par les organes cibles. Nos résultats affichent une augmentation significative de cette hormone dans le plasma de souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Ceci est donc en concordance avec les études précédentes qui rapportent le développement d'une résistance à l'insuline consécutive à une augmentation de la quantité d'acide gras chez des souris ob/ob ou HFD. Cette résistance serait liée à l'inflammation subséquente à l'augmentation de sécrétion d'adipokines (Bastard *et al.*, 2006 ; Fan *et al.*, 2014).



## 2. Atteintes des adipocytes suite à un régime riche en graisse chez la souris C57BL/6

Au niveau du tissu adipeux, la coloration hématoxyline et éosine a permis de mettre en évidence une augmentation de la taille de ces cellules chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Pour confirmer ce changement morphologique, la taille des adipocytes a été déterminée grâce à une méthode d'analyse d'image automatique. La taille moyenne des adipocytes en  $\mu\text{m}^2$  du groupe HFD est significativement plus importante en comparaison avec celle mesurée dans le groupe LFD. Comme expliqué précédemment, cette augmentation est la conséquence de l'accumulation de TG résultant de l'ingestion élevée de lipides. Cette accumulation de TG pourrait provenir d'une déficience mitochondriale comme démontré dans une précédente étude. En effet, cette étude met en évidence une augmentation du contenu en TG cytosolique à la suite d'une inhibition de la phosphorylation oxydative grâce à l'antimycine A. L'origine de cette déficience pourrait être l'hypoxie (Vankoningsloo *et al.*, 2005). Les observations morphologiques ont également montré une augmentation du dépôt de matrice extracellulaire (MEC) ainsi qu'un nombre plus élevé de cellules interstitielles chez les souris HFD. Ceci concorde avec les précédentes études mettant en évidence un remodelage de la MEC pour supporter l'augmentation de taille des adipocytes (Henegar *et al.*, 2008 ; Khan *et al.*, 2009 ; Spencer *et al.*, 2011). A ce sujet, il a été suggéré qu'une fibrose pourrait induire des dysfonctionnements du tissu adipeux (Trayhurn, 2014). Une augmentation de la synthèse des composants impliqués dans la formation de la MEC a été observée chez des souris HFD et pourrait résulter de l'augmentation de l'hypoxie qui mènerait à l'inflammation. En effet, une inhibition de HIF-1 grâce à un inhibiteur de la protéine permet d'améliorer la fibrose chez ces souris HFD (Sun *et al.*, 2013). De plus, l'exposition d'adipocytes de souris HFD à des conditions hypoxiques (10% O<sub>2</sub>) induit une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la MEC, comme le collagène (Halberg *et al.*, 2009).

Comme conséquence majeure de l'obésité, nous pouvons citer en premier lieu l'inflammation. En effet, l'infiltration des macrophages au niveau du tissu adipeux est l'un des premiers événements subséquent à l'augmentation de l'ingestion de nourriture riche en lipides (Guilherme *et al.*, 2008). Il a été démontré que cette augmentation résulterait tout d'abord de l'accumulation de MCP-1, une cytokine produite entre autre par le tissu adipeux en réponse à des stimuli inflammatoires, comme par exemple le TNF- $\alpha$  (Berg et Scherer, 2005). Nous avons donc réalisé une qPCR de façon à mettre en évidence le niveau d'ARNm codant pour MCP-1 dans le tissu adipeux et avons ainsi observé une augmentation significative d'ARNm chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Sartipy et Loskutoff ont également mis ce résultat en évidence en montrant que des adipocytes murins de souris ob/ob affichaient une quantité d'ARNm codant pour MCP-1 beaucoup plus élevée que chez des souris wild-type (Sartipy et Loskutoff, 2003). De plus, ces adipocytes murins présentaient une quantité 10 à 100 fois plus élevée d'ARNm codant pour MCP-1 que le foie ou les reins. Enfin, les souris wild-type ne présentaient pas de résistance à l'insuline contrairement aux souris ob/ob, il a été suggéré que la cytokine MCP-1 pouvait être l'une des molécules responsable de la résistance à l'insuline (Sartipy et Loskutoff, 2003). En effet, l'expression d'un transgène codant pour MCP-1 dans le tissu adipeux de souris est suffisante pour induire l'infiltration de macrophages dans ce tissu, suivie du développement d'une résistance à l'insuline (Kanda *et al.*, 2006). Cependant, le temps de demi-vie et l'efficacité traductionnelle de cet ARNm chez les individus obèses sont actuellement peu caractérisés et l'ARNm transcrit peut par la suite être dégradé. La quantité de protéine MCP-1 ne concorde donc pas forcément avec la quantité d'ARNm mesurée (Sartipy et Loskutoff, 2003). Par conséquent, nous avons également procédé au dosage tissulaire de



MCP-1. Les résultats obtenus sont en concordance avec les observations relatives à l'ARNm étant donné que la concentration de MCP-1 dans le tissu adipeux des souris HFD est significativement plus élevée que celle mesurée chez les souris LFD. De même, nous avons observé une augmentation du nombre de macrophages dans le tissu adipeux des souris HFD grâce à une analyse par immunohistochimie, mettant ainsi en évidence un lien entre obésité et réponse inflammatoire. L'inflammation, et en particulier l'accumulation de macrophages, serait consécutive à une hypoxie du tissu adipeux. En effet, *in vitro*, les adipocytes murins soumis à une faible  $pO_2$  affichent une augmentation du nombre de macrophages au niveau des zones présentant de l'hypoxie (Lewis *et al.*, 1999 ; Murdoch *et al.*, 2005). De plus, la diminution de PPAR- $\gamma$  serait également responsable de l'augmentation de l'inflammation. Pour cette raison, l'utilisation d'un agoniste de ce facteur de transcription permet la diminution de l'accumulation de macrophages (Hulsmans *et al.*, 2013). Le tissu adipeux chez le sujet obèse est donc caractérisé par une inflammation chronique de bas-grade pouvant contribuer à la résistance à l'insuline. Il semblerait que la quantité de MCP-1 adipocytaire soit directement corrélée avec l'IMC (Kanda *et al.*, 2006).

Les stress oxydatifs et nitrosatifs sont également une conséquence de l'obésité. Dans notre étude, il aurait été intéressant de mettre en évidence la quantité de  $H_2O_2$  au niveau de la phase chloroforme du triphase du tissu adipeux. Il serait logique de postuler que l'on devrait observer une augmentation de  $H_2O_2$  chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD comme l'ont montré d'autres études (Galinier *et al.*, 2006 ; Loh *et al.*, 2010 ; Frohnert *et al.*, 2011 ; Tormos *et al.*, 2012). Par exemple, des rats Zucker obèses présentent des altérations fonctionnelles mitochondriales et libèrent donc une quantité plus importante de  $H_2O_2$  que les rats non-obèses (Hey-Mogensen *et al.*, 2012). Le rôle des ROS au niveau du tissu adipeux n'est pas très clair. En effet, une concentration faible de  $H_2O_2$  est nécessaire pour la différenciation des cellules souches en adipocytes. L'ajout d'anti-oxydants au niveau de la mitochondrie mènerait à l'inhibition de la différenciation des adipocytes et cet effet serait inversé grâce à l'ajout de  $H_2O_2$  exogène (Loh *et al.*, 2010 ; Tormos *et al.*, 2012). Cependant, à une concentration trop élevée, les ROS peuvent inhiber la chaîne de transport d'électrons au niveau de la mitochondrie et diminuer la prolifération et la différenciation des adipocytes (Carrière *et al.*, 2004). De plus, une diminution de la sécrétion d'adiponectines mènerait à une augmentation de la production de ROS et donc de stress oxydatifs (Furukawa *et al.*, 2004). Afin de caractériser le stress nitrosatif, nous avons réalisé une analyse par immunohistochimie. Le stress nitrosatif se produit lorsque le NO réagit avec l'anion superoxyde et forme ainsi de la nitrotyrosine. Cette molécule peut ensuite interagir avec des lipides, l'ADN ou les tyrosines de certaines protéines et empêcher le fonctionnement de ces molécules. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu quantifier les résultats et avons plutôt réalisé une analyse qualitative des photos. Nous en avons conclu que le tissu adipeux de souris HFD présentait un niveau de coloration plus élevé que celui observé chez les souris LFD. Ces résultats ont été confirmés dans la littérature par Codoner-Franch *et al.*, qui ont mis en évidence une augmentation de la nitrotyrosine chez des enfants obèses en comparaison avec des enfants sains (Codoner-Franch *et al.*, 2011).



### 3. Atteintes des hépatocytes suite à un régime riche en graisse chez la souris C57BL/6

En ce qui concerne le foie, une augmentation de poids a été observée après 16 semaines de traitement avec de la nourriture HFD. Ce résultat pourrait traduire le développement d'une stéatose hépatique, qui consiste en une accumulation de lipides au niveau des hépatocytes et pourrait résulter en une augmentation de la masse de l'organe. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons tenté de mettre en évidence la stéatose hépatique grâce à la coloration hématoxyline et éosine. Cette analyse a révélé une accumulation de vacuoles dans les hépatocytes des souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Ces vacuoles étaient presque aussi larges que le noyau et parfois même plus. Ceci correspond aux résultats publiés dans des études précédentes, rapportant une accumulation de vacuoles au niveau des hépatocytes de souris ob/ob (Hubscher, 2006). Afin de mieux caractériser ces larges vacuoles, nous avons réalisé une coloration oil red O permettant de mettre en évidence les lipides neutres. Une accumulation de la coloration rouge a été observée chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD, laissant supposer que ces vacuoles étaient composées, au moins en partie, de lipides neutres. Selon la littérature, ces vacuoles résulteraient d'une dyslipidémie au niveau de cet organe. En effet, une augmentation de la synthèse des acides gras, une diminution de la  $\beta$ -oxydation, une diminution de l'exportation des TG par les VLDL et une augmentation des récepteurs permettant de capter les acides gras sanguins ont été mis en évidence dans plusieurs études (Shimano *et al.*, 1997 ; Shimomura *et al.*, 1999 ; Ibdah *et al.*, 2005 ; Adiels *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Greco *et al.*, 2008 ; Fabbrini *et al.*, 2008 ; Fabbrini *et al.*, 2009). De façon à démontrer ce trouble du métabolisme au niveau du foie, nous avons mesuré le niveau de TG et d'acide gras, et mis ainsi en évidence une augmentation de la concentration de TG chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Cela traduit une accumulation de lipides stockés dans le foie. Selon certains auteurs, il s'agirait d'une réponse physiologique à l'augmentation de la consommation d'acides gras et serait protectrice plutôt que néfaste. En effet, il a été démontré que lors de stéatoses, on observait une accumulation de lipides hépatiques mais pas de dommages cellulaires, laissant supposer un rôle protecteur de ceux-ci (Tilg et Moschen, 2010). D'autres études rapportent également une augmentation du niveau de TG chez des souris HFD en comparaison avec les souris LFD suite à une augmentation de ppar- $\gamma$  (Westerbacka *et al.*, 2007). La concentration de TG hépatiques mesurée chez les HFD était plus de 2 fois supérieur à celle des souris nourries avec une nourriture standard (Fabbrini *et al.*, 2009). Cette accumulation de TG proviendrait du fait que le tissu adipeux soit incapable de stocker le surplus de TG, ce qui conduirait à une accumulation ectopique de ces lipides, notamment au niveau des hépatocytes induisant ainsi des stéatoses hépatiques non-alcooliques. De plus, l'augmentation de la concentration plasmatique d'acides gras mène à un stockage accru de ceux-ci au niveau du foie sous forme de TG (Bradbury, 2006 ; Kawano and Cohen, 2013). Concernant les NEFA, nous avons également observé une augmentation de leur concentration chez les souris HFD en comparaison aux souris LFD, mais cette différence n'était pas significative. Si l'on se réfère à la littérature, nous pouvons observer que la lipolyse est augmentée durant la résistance à l'insuline puisqu'il n'y a plus d'inhibition de la HSL du tissu adipeux par l'insuline. Il en résulte une augmentation d'acides gras libres dans le sang provenant de la lipolyse des TG du tissu adipeux et les lipides s'accumulent au niveau hépatique. Jensen *et al.* montrent également une augmentation des AGL chez des femmes obèses en comparaison avec des femmes saines (Jensen *et al.*, 1989). Notre résultat ne corrèle donc pas avec la littérature et d'autres tests pourraient se révéler utiles.



Comme pour le tissu adipeux, on retrouve de l'inflammation liée à l'obésité au niveau du foie, qui pourrait être la conséquence d'une augmentation de la sécrétion de certaines adipokines. En effet, une élévation des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 résulte en une augmentation de l'inflammation hépatique et pourrait conduire au développement de stéatoses (Shimizu *et al.*, 2013). Nous avons ainsi mis en évidence la présence de cellules inflammatoires au niveau du foie grâce à une analyse par immunohistochimie. Les macrophages, qui se retrouvent entre les hépatocytes sous forme de cellules allongées, sont en augmentation chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Les macrophages, en sécrétant du TNF- $\alpha$ , joueraient un rôle dans la résistance à l'insuline puisque des souris TNF- $\alpha^{-/-}$  semblent être protégées contre cette résistance (De Taeye *et al.*, 2007). Par ailleurs, Morinaga *et al.* ont démontré que le nombre de ces macrophages, recrutés au niveau hépatique chez les sujets obèses, était 6 fois plus élevé en condition HFD. De plus, ces cellules présentaient un caractère inflammatoire plus important car elles sécrétaient de plus grandes quantités de TNF- $\alpha$  (Morinaga *et al.*, 2014). Comme l'accumulation des macrophages est la conséquence d'une augmentation de la quantité de MCP-1, nous avons également réalisé une qPCR afin de mettre en évidence la quantité relative d'ARNm codant pour MCP-1. A nouveau, nous avons pu observer une augmentation d'ARNm chez les souris HFD au niveau du foie en comparaison avec les souris LFD. Une étude de Kanda *et al.* a mis en évidence le fait que des souris KO pour MCP-1 présentaient une réduction significative de l'accumulation de macrophages mais également de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique observées en cas d'obésité (Kanda *et al.*, 2006). Les résultats que nous avons obtenus ont été complétés par l'analyse quantitative de la concentration de MCP-1. Grâce à ce dosage, nous avons observé une augmentation significative de cette concentration au niveau du foie des souris HFD. Il est intéressant de noter que des observations similaires ont été effectuées chez des souris surexprimant MCP-1. Celles-ci présentaient une augmentation du niveau d'ARNm hépatique codant pour SREBP-1c, un facteur de transcription important pour la régulation de la synthèse lipidique. En effet, ces souris étaient caractérisées par un niveau d'acides gras libres et de TG hépatiques plus élevés que les wild-type. Ces résultats tendent à démontrer un trouble du métabolisme du glucose et des lipides consécutifs à la réponse inflammatoire (Sartipy et Loskutoff, 2003 ; Kanda *et al.*, 2006).

De nombreuses études établissent un lien entre inflammation et résistance à l'insuline (Fujimoto *et al.*, 2005 ; Tsuchiya *et al.*, 2007 ; Charbonneau et Marette, 2010). Même si l'origine exacte de la résistance à l'insuline liée à l'obésité est un mécanisme complexe et actuellement peu connu, il a été démontré que l'augmentation d'adipokines inflammatoires, comme par exemple TNF- $\alpha$ , pouvait inhiber certaines molécules de la voie de signalisation de l'insuline. L'augmentation des acides gras libres, en menant à une lipotoxicité, pourrait également jouer un rôle dans la résistance à l'insuline en phosphorylant les résidus sérines de IRS-1 et AKT (Guilherme *et al.*, 2008). Pour mettre en évidence ce processus de résistance à l'insuline, nous avons réalisé une analyse par Western Blot de la protéine AKT présente au niveau du foie. En cas d'obésité, la voie de signalisation PI3K/AKT est sous-régulée, participant ainsi à l'insulino-résistance (Kim *et al.*, 2008). Nous avons observé que la quantité de protéine AKT chez les souris HFD était supérieure à celle mesurée chez les souris LFD. Cependant, il faut être prudent quant à l'interprétation de ces résultats pour différentes raisons. Tout d'abord, il ne s'agit pas de la protéine phosphorylée, la forme active de l'AKT. Il serait donc nécessaire de refaire l'analyse en utilisant un anticorps anti-AKT phosphorylé. Nous avons réalisé cette expérience grâce à un Western Blot. Malheureusement, l'anticorps ne semblait pas fonctionner correctement car le gel ne mettait aucune protéine en évidence. Cela pourrait aussi provenir du fait que les protéines peuvent être déphosphorylées et il aurait donc fallu ajouter des inhibiteurs de phosphatases. De plus, la quantité de protéines phosphorylées est faible en comparaison à la



quantité de protéines totale, il pourrait donc être intéressant de réaliser une immunoprécipitation avant le Western Blot de façon à amplifier le niveau de détection de la protéine. Dans la littérature, il a été montré que le niveau d'AKT phosphorylée diminue dans le foie des souris HFD en comparaison avec les souris LFD (Kim *et al.*, 2008). En outre, lors de précédentes études, des résultats significatifs n'ont été obtenus qu'après avoir injecté de l'insuline par la voie intrapéritonéale mais aucune différence significative n'a été relevée en l'absence d'injection. Dans notre modèle, nous n'avons pas injecté les souris avec de l'insuline. Finalement, nous avons également mis en évidence le niveau d'IRS-1 phosphorylée au niveau des résidus sérines grâce à une analyse par immunohistochimie. Il semblerait que le niveau de cette protéine soit plus élevé chez les souris HFD que chez les souris LFD. Cependant, une quantification de la protéine serait intéressante afin de confirmer le résultat visuel. De plus, comme pour AKT, il faut tenir compte du fait que les souris n'ont pas été injectées avec de l'insuline. Il serait logique de penser qu'il se produit une augmentation de la concentration de la protéine phosphorylée chez les souris HFD. En effet, la phosphorylation de la sérine 612 d'IRS-1 empêche le fonctionnement de la voie de signalisation à l'insuline. Cela serait sans doute la conséquence d'une inflammation ou d'une accumulation d'acides gras et comme ces phénomènes sont augmentés chez les souris HFD, la concentration d'IRS-1 phosphorylée serait par conséquent également augmentée. Si l'on compare avec une précédente étude, on note la mise en évidence d'un lien entre la phosphorylation d'IRS-1 et la résistance à l'insuline. Cette phosphorylation serait la conséquence d'une inflammation car chez les souris JNK<sup>-/-</sup>, la phosphorylation d'IRS-1 diminue de façon significative (Go *et al.*, 2002). De plus, nos résultats révèlent une augmentation du marquage pour IRS-1 plus important au niveau des vaisseaux sanguins. Cela pourrait être dû au fait que la résistance à l'insuline se développe plus rapidement au niveau des vaisseaux qu'au niveau des organes. En effet, Kim *et al.* ont démontré qu'une inactivation par phosphorylation des molécules de la voie de signalisation de l'insuline au niveau de l'aorte se produisait après 4 semaines mais que celle-ci ne survenait qu'après 8 semaines au niveau du foie et du tissu adipeux (Kim *et al.*, 2008). La résistance à l'insuline pourrait également provenir de l'accumulation de TG hépatiques. En effet, Korenblat *et al.* ont démontré que l'excès de TG hépatiques était corrélé à des troubles de la voie de transduction de l'insuline au niveau du foie, des muscles et du tissu adipeux lui-même. En effet, après un repas, l'insulinémie de 42 sujets obèses présentant une quantité de TG intrahépatiques différente (de 1% à 46%) a été évaluée grâce à un traceur dans leur sang. Plus la quantité de TG était élevée, moins la sensibilité à l'insuline était présente au niveau des organes de ces patients (Korenblat *et al.*, 2008). De plus, les modèles animaux de lipotrophies mettent en évidence une extension massive de l'accumulation de TG par les tissus non-adipeux et montrent une extrême résistance à l'insuline suite à l'absence de tissus adipeux (Hegele, 2000 ; Gavrilova, 2000). Ceci met donc en évidence le fait que la genèse de la résistance à l'insuline est complexe et multifactorielle.

Le dernier corollaire de l'obésité que nous avons étudié concerne les stress oxydatifs et nitrosatifs. Pour mettre en évidence les stress oxydatifs au niveau du foie, nous avons réalisé un dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la phase méthanol du triphase du foie. On remarque ainsi une tendance à l'augmentation de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. L'étude de Lacraz *et al.* rapporte des résultats similaires, soit une augmentation de la quantité de ROS suite à un régime HFD (Lacraz *et al.*, 2008). Concernant le stress nitrosatif, nous avons également réalisé une analyse par immunohistochimie au niveau du foie. Les images obtenues montrent que les souris HFD présentaient un niveau de marquage plus élevé que les souris LFD et donc présenteraient des stress nitrosatifs plus élevés. Cependant, comme pour le tissu adipeux, nous n'avons pas quantifié ces résultats, ce qui pourrait être utile pour confirmer notre hypothèse. Une étude précédente démontre, grâce à l'utilisation d'un kit ELISA, que la



concentration de nitrotyrosine des animaux obèses est plus élevée que pour les non-obèses (Mandal *et al.*, 2013). Nos résultats mettent en évidence un niveau de stress nitrosatif important au niveau des vaisseaux sanguins, qui pourrait s'expliquer par le fait que ces stress sont présents tout d'abord dans les vaisseaux sanguins avant d'atteindre les organes (Kim *et al.*, 2008). Cela pourrait aussi suggérer un découplage de la eNOS étant donné que la localisation de cette enzyme corrèle avec la localisation des stress nitrosatifs. Il serait intéressant de pouvoir mettre en évidence l'expression de la iNOS sur des coupes histologiques afin de démontrer une éventuelle corrélation entre cette enzyme produisant du NO, plutôt dans des conditions physiopathologiques, et les risques de stress nitrosatifs.

#### 4. Métabolisme du NO durant l'obésité et effet du L-NIL

Selon certaines études, le NO aurait un rôle dans le contrôle du métabolisme du glucose et des lipides (Ribiere *et al.*, 1996; Kapur *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 1999 ; Tsuchiya *et al.*, 2007). En cas d'obésité, il a été démontré que l'expression de la eNOS diminuait mais qu'au contraire, celle de la iNOS augmentait (Fujimoto *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2007). Il en résulterait donc une augmentation du NO inflammatoire produit par la iNOS, le NO ainsi produit pouvant conduire au développement de stress nitrosatifs, serait donc délétère pour les tissus (Fernandez-Sanchez *et al.*, 2011). De même, une diminution de NO produit par la eNOS pourrait également s'avérer préjudiciable car pouvant déterminer une dysfonction endothéliale. En effet, des souris déficientes pour le gène de la eNOS présentent une résistance à l'insuline, de l'hypertension et de la dyslipidémie. Au contraire, les souris KO pour la iNOS semblent être protégées de ces troubles métaboliques (Hugli *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2005). Ces observations pourraient être liées au double rôle du NO, celui-ci ayant un rôle bénéfique et néfaste sur l'homéostasie du glucose. Une quantité physiologique de NO, principalement produit par la eNOS et la nNOS, jouerait un rôle protecteur dans l'homéostasie du glucose alors que le NO produit par la iNOS aurait des effets délétères et mènerait à l'installation d'une insulino-résistance (Nomiyama *et al.*, 2004). Pour mettre en évidence l'enzyme eNOS, nous avons réalisé une analyse par immunohistochimie et pu montrer ainsi une diminution de l'expression de cette enzyme chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD au niveau du tissu adipeux et du foie (non-significative pour ce dernier organe). Puisque cette enzyme est endothéliale, il est logique de la retrouver au niveau des vaisseaux des différents tissus. Les résultats obtenus sont en corrélation avec les études précédentes (Fruebis *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2012). Cette diminution d'expression de la eNOS et par conséquent de la production de NO, pourrait être due à une déficience de l'enzyme ou une diminution de la disponibilité du substrat ou encore de cofacteurs essentiels impliqués dans la synthèse du NO. Cette déficience de l'enzyme pourrait provenir d'une altération de la phosphorylation de la sérine 1179 qui, en temps normal, permet d'augmenter l'activité de l'enzyme. Par exemple, il a été prouvé qu'une concentration élevée de glucose altérerait la dimérisation de l'enzyme et sa phosphorylation (Fruebis *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que la résistance à l'insuline, en diminuant l'activité de l'AKT kinase, induit une diminution de la phosphorylation de la eNOS (Cheng *et al.*, 2012). La diminution de production d'adiponectine induit également une chute de la phosphorylation de la eNOS au niveau des cellules endothéliales, et donc une diminution de l'activité de cette enzyme (Van de Voorde *et al.*, 2013). En résumé, les résultats obtenus dans notre étude sont probablement la conséquence d'une altération de l'activité de la eNOS en réponse à des changements métaboliques causés par l'obésité. Il est important de noter que le L-NIL ne restaure pas l'expression de la eNOS dans le tissu adipeux et le foie. Ceci suggère qu'il n'y aurait aucune interférence entre les activités de ces deux isoformes de NOS. Par la suite, nous avons essayé de réaliser une analyse



par Western Blot de la eNOS phosphorylée qui est donc la forme active, afin de mettre en évidence l'activité de l'enzyme. Cependant, le résultat n'a montré aucune protéine sur le gel probablement pour les mêmes raisons que pour la mise en évidence de la phospho-AKT. L'utilisation d'un phos-tag (Wako, Danemark), pourrait être envisagée car cette molécule lie les ions phosphates de façon spécifique et permet la formation d'un complexe plus stable afin de faciliter la détection de la protéine phosphorylée (Kinoshita *et al.*, 2009). Si l'on se réfère à de précédentes études, la eNOS phosphorylée était significativement moins présente chez les HFD que chez les LFD (Tsuchiya *et al.*, 2007 ; Touati *et al.*, 2011). Il est à noter que nous avons essayé de mettre en évidence l'expression de la iNOS par analyse immunohistochimique. Cependant, cette technique n'a pas fonctionné dans nos conditions expérimentales et d'autres analyses seront nécessaires. Beaucoup d'études rapportent une augmentation de l'expression de cette enzyme dans le tissu adipeux et les muscles chez les souris HFD (Fujimoto *et al.*, 2005 ; Tsuchiya *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008). Dans le foie, différentes études montrent une augmentation de l'expression de la iNOS chez les souris HFD (Sugita *et al.*, 2002 ; Fujimoto *et al.*, 2005).

Pour chaque expérience réalisée, nous avons évalué l'effet d'un traitement au L-NIL permettant l'inhibition de la iNOS. Cette approche devrait permettre une diminution du NO produit par cette enzyme, qui est principalement de nature inflammatoire. Tout d'abord, le traitement au L-NIL permet une diminution du poids des souris HFD sans faire varier le poids des LFD. Une étude utilisant du L-NAME affiche les mêmes résultats (Tsuchiya *et al.*, 2007). Par contre, ce traitement ne semble pas prévenir l'augmentation du poids du foie ; au contraire, il augmenterait même le poids de cet organe. Des études supplémentaires seraient donc utiles en vue d'établir un lien potentiel entre le NO et l'augmentation de la masse de cet organe. Concernant le tissu adipeux, les analyses histologiques ont permis d'observer une réduction de la taille des adipocytes des souris HFD traitées avec du L-NIL. Ceci a été observé dans une précédente étude utilisant du L-NAME, un inhibiteur non sélectif des NO synthases (Tsuchiya *et al.*, 2007). Concernant le métabolisme des lipides, il semblerait que le L-NIL prévient la dyslipidémie, tout au moins en partie, puisque l'on observe une diminution de des concentrations plasmatiques de NEFA et de TG chez les souris HFD+L-NIL en comparaison avec les souris HFD. Au niveau hépatique, on observe toujours une amélioration de la concentration de TG mais, de façon surprenante, le L-NIL ne semble pas avoir d'effet sur la concentration de NEFA. Au niveau du tissu adipeux, le NO synthétisé par la iNOS semble augmenter la lipolyse et donc l'augmentation de NEFA dans le sang semble tout à fait logique. Au niveau du foie, le L-NIL utilisé chez des souris ob/ob semble réduire l'hyperglycémie observée (Kapur *et al.*, 2000 ; Fujimoto *et al.*, 2005 ; Tsuchiya *et al.*, 2007). Ces observations mettent en évidence un lien entre l'iNOS et un trouble du métabolisme des lipides au sein de ces organes.

Le traitement au L-NIL semble diminuer l'inflammation au niveau du tissu adipeux mais pas du foie. Ce résultat ne corrèle pas avec les études précédentes réalisées sur le sujet où les auteurs montrent que le L-NAME, un inhibiteur des NOS, sous-régule l'expression des macrophages et de MCP-1 (Tsuchiya *et al.*, 2007). Dans le foie, nous avons observé un accroissement de la quantité de macrophages et de MCP-1, ce qui suggère une augmentation de l'inflammation. Dans cet organe, le L-Nil semble diminuer le niveau d'inflammation mais ces résultats ne sont cependant pas significatifs. Concernant MCP-1, facteur chémo-attractant induisant une réponse inflammatoire par le recrutement de monocytes, il est intéressant de souligner qu'il a été plus récemment reconnu comme une adipokine-clef induisant la résistance à l'insuline chez les souris obèses. En effet, les souris KO pour MCP-1 présentent une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de l'accumulation de macrophages.



Certaines études montrent que MCP-1 est abondamment exprimé dans le tissu adipeux et que le niveau plasmatique augmente chez les souris obèses (Kanda *et al.*, 2006 ; Tsuchiya *et al.*, 2007). Cependant, le L-NIL semble diminuer la concentration de cette molécule, probablement en diminuant la taille des adipocytes ce qui mènerait à la diminution de sécrétion d'adipokines inflammatoires et à la réduction d'accumulation de macrophages.

Le traitement au L-NIL semble prévenir l'augmentation de la concentration plasmatique de l'insuline observée chez les souris HFD en comparaison avec les souris LFD. Il permet également de diminuer la concentration plasmatique de glucose. Ceci est cohérent avec les études réalisées sur le sujet, qui rapportent une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des souris ob/ob traitées avec du L-NIL (Fujimoto *et al.*, 2005). Ceci pourrait être dû à une nitrosylation de certaines molécules de la voie de signalisation à l'insuline par le NO. En effet, les stress nitrosatifs régulent négativement l'AKT, le récepteur à l'insuline mais également IRS-1 menant ainsi à une inhibition de la signalisation (Nomiyama *et al.*, 2004; Charbonneau *et al.*, 2010). Ceci suggère qu'une augmentation de l'expression de la iNOS et/ou de son activité en cas d'obésité pourrait affecter la signalisation d'insuline par la production de NO interagissant avec les radicaux O<sub>2</sub>, formant ainsi du peroxynitrite induisant la S-nitrosylation des cystéines ou la nitration des tyrosines du récepteur à l'insuline, de IRS-1 et d'AKT. Ces processus les empêcheraient d'être phosphorylées, donc d'être actives, ce qui inhibe la voie de signalisation de l'insuline (Fujimoto *et al.*, 2005 ; Philip *et al.*, 2010). Concernant notre analyse par Western Blot, le L-NIL ne semble pas augmenter le niveau d'AKT, probablement pour les mêmes raisons que cité précédemment. Concernant IRS-1 phosphorylé, il ne semble pas y avoir d'effet du L-NIL. Cependant, une quantification permettrait de préciser ce que nous observons. Logiquement, une diminution de NO mènerait à une diminution de peroxynitrite capable de réagir avec les tyrosines d'IRS-1 et d'empêcher sa phosphorylation au niveau de ces tyrosines. Il y aurait donc plus d'IRS-1 phosphorylé en cas d'inhibition de la iNOS. Une étude de Nomiyama *et al.* démontre notamment que le 3-(4-morpholinyl)sydnimine hydrochloride (SIN-1), un producteur constitutif de peroxynitrite, diminue la concentration protéique de IRS-1 et diminue sa phosphorylation dans des cellules 3T3-L1 de préadipocyte en culture (Nomiyama *et al.*, 2004). Ceci montre bien qu'il peut se produire une diminution de phospho-IRS-1 lors de stress nitrosatifs, probablement en faveur d'une nitrosylation des tyrosines de cette molécule.

## 5. Conclusion et perspectives

En conclusion, au sein de notre laboratoire, nous avons reproduit un modèle d'obésité lié au syndrome métabolique chez des souris C57BL/6. Ces souris, exposées à une alimentation riche en lipides, présentent une hypertrophie hépatique traduisant une stéatose hépatique non-alcoolique, ainsi qu'un trouble du métabolisme lipidique. En effet, nous avons observé une augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires en NEFA et en TG en réponse à l'ingestion d'une quantité élevée d'acides gras. Les souris atteintes d'obésité présentent également une résistance à l'insuline, caractérisée par une hyper-insulinémie. De plus, la voie de signalisation de cette hormone semblait perturbée. L'origine de cette résistance n'est actuellement pas connue et pourrait provenir de l'accumulation de TG dans les tissus non-adipeux, qui deviendraient par la suite résistants à l'insuline, ou bien de l'hypoxie du tissu adipeux et de l'inflammation conséquente. En effet, l'obésité est une maladie caractérisée par un état inflammatoire chronique. C'est ce que nous avons pu observer dans notre modèle grâce à la mise en évidence de la présence de macrophages et d'une concentration plus élevée de MCP-1 au niveau du tissu adipeux et du foie de ces souris obèses. Cette inflammation serait la conséquence de l'augmentation de la sécrétion d'adipokines par le tissu adipeux. Finalement,



des stress oxydatifs et des stress nitrosatifs au sein du tissu adipeux et du foie ont été mis en évidence et résulteraient probablement d'une dysfonction mitochondriale due à l'accumulation des acides gras. Les stress nitrosatifs peuvent être une conséquence de l'augmentation de l'expression ou de l'activité de la iNOS, ce qui pourrait accroître la production de NO et mener à des effets délétères. En effet, il a été observé que l'enzyme iNOS augmentait en cas d'obésité. Pour cette raison, nous avons utilisé dans notre modèle expérimental un inhibiteur de cette enzyme, le L-NIL, afin de limiter la production de NO dérivant de la iNOS. Dans ces conditions, nous avons pu observer deux améliorations significatives grâce à ce traitement : 1) le L-NIL peut prévenir l'augmentation de la taille des adipocytes. Puisque la sécrétion d'adipokines est proportionnelle à la taille de ces cellules, cette diminution de taille aura un effet bénéfique sur le niveau d'inflammation car ces cytokines sont principalement pro-inflammatoires. 2) On observe également une diminution de la résistance à l'insuline puisque la production réduite de NO inflammatoire mène à une diminution de stress nitrosatif et donc de la nitrosylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation à l'insuline. Cependant, le traitement ne semble pas avoir d'impact sur le poids du foie. Au vu de ces résultats, le L-NIL semble donc utile afin d'améliorer les conséquences de l'obésité sur les différents organes mais ne permet pas de rétablir entièrement les paramètres histologiques et physiologiques de ces organes.

De multiples perspectives peuvent être envisagées en vue d'approfondir l'étude de ce processus physiopathologique complexe. Tout d'abord, d'autres organes, tels que les muscles et le cœur, peuvent être étudiés de façon à mettre en évidence les effets d'une nourriture HFD. Les études sur le muscle ont été commencées dans notre laboratoire, mais les résultats n'étaient pas aussi probants que pour le foie. Aussi, d'autres méthodes peuvent être utilisées afin de mettre en évidence une accumulation de lipides ectopiques, une résistance à l'insuline ou une inflammation. Pour ce faire, des techniques telles que la coloration oil red o (sur tissus OCT), la détection de la présence de protéines actives de la voie de signalisation par Western Blot ou bien le dosage de cytokines inflammatoires (IL-6 ou TNF- $\alpha$ ) pourraient être utilisées. De plus, il pourrait également être intéressant de déterminer si les anomalies observées suite à un régime HFD s'améliorent quand les souris sont nourries avec de la nourriture LFD ou « standard ». Vu le grand nombre d'études portant sur le rôle de l'hypoxie comme facteur clef impliqué dans le développement de l'inflammation et la résistance à l'insuline, il pourrait également être intéressant de l'étudier plus en profondeur. Pour cela, différentes techniques pourraient être utilisées : la mise en évidence du facteur de transcription HIF grâce à un Western Blot ou la mesure de la pression partielle en oxygène tissulaire, afin de mettre en évidence un lien entre l'hypoxie et la réponse cellulaire ou encore, l'injection de pimonidazole avant l'euthanasie pour mettre en évidence les sites d'hypoxie. De façon à imiter l'obésité induite chez l'homme, il pourrait aussi être pertinent d'ajouter du sucrose dans l'eau de boisson des souris et mettre en évidence un effet des sucres, en association avec des lipides, sur l'organisme. Finalement, un point important à réaliser lors de la réalisation d'un protocole similaire, est l'injection d'insuline la nuit avant l'euthanasie de façon à pouvoir mettre en évidence l'activation des molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline.



# **BIBLIOGRAPHIE**



---

## Bibliographie

---

- Adamczak, M., and A. Wiecek. 2013. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* 33:2–13.
- Adiels, M., M.-R. Taskinen, C. Packard, M.J. Caslake, a Soro-Paavonen, J. Westerbacka, S. Vehkavaara, a Häkkinen, S.-O. Olofsson, H. Yki-Järvinen, and J. Borén. 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia.* 49:755–65.
- Ali, A. trizol protocole. Retrievd September 15, 2014, from <http://itghumangenomeprojectwallpapars.blogspot.be/2012/12/trizol-protocol.html>
- Altunkaynak, Z. 2005. Effects of high fat diet induced obesity on female rat livers (A histochemical study). *Eur J Gen Med.* 2:100–109.
- Alvheim, A.R., B.E. Torstensen, Y.H. Lin, H.H. Lillefosse, L. Madsen, J.R. Hibbeln, and M.K. Malde. 2013. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2- arachidonoylglycerol and anandamide in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and mice, and induces weight gain and inflammation in mice. *Br J Nutr.* 109:1508–1517.
- Andersson, K., N. Gaudiot, C. Ribiere, M. Elizalde, Y. Giudicelli, and P. Arner. 1999. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 126:1639–45.
- Bastard, J.-P., M. Maachi, C. Lagathu, M.J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, and B. Feve. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17:4–12.
- Belfort, R., L. Mandarino, S. Kashyap, K. Wirfel, T. Pratipanawat, R. Berria, R. a Defronzo, and K. Cusi. 2005. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes.* 54:1640–8.
- Berg, A.H., and P.E. Scherer. 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96:939–49.
- Berlanga, A., E. Guiu-Jurado, J.A. Porras, and T. Auguet. 2014. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7:221–39.
- Bradbury, M.W. 2006. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290:194–198.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 2008. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 7:95–6.
- Bruce, K.D., and C.D. Byrne. 2009. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad. Med. J.* 85:614–21.

- Carrière, A., M.-C. Carmona, Y. Fernandez, M. Rigoulet, R.H. Wenger, L. Pénicaud, and L. Casteilla. 2004. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* 279:40462–9.
- Charbonneau, A., and A. Marette. 2010. Potential Role of Tyrosine Nitration of Insulin Signaling Proteins. *Diabetes*. 59:861–871.
- Chavez, J.A., and S. a Summers. 2003. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* 419:101–109.
- Chen, B., K.S.L. Lam, Y. Wang, D. Wu, M.C. Lam, J. Shen, L. Wong, R.L.C. Hoo, J. Zhang, and A. Xu. 2006. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:549–56.
- Cheng, H., H. Wang, X. Fan, P. Pauksakon, and R.C. Harris. 2012. Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney Int.* 82:1176–83.
- Chudek, J., M. Adamczak, T. Nieszporek, and A. Wiecek. 2006. The adipose tissue as an endocrine organ- A nephrologists' perspective. *Obes. kidney*. 151:70–90.
- Codoñer-Franch, P., S. Tavárez-Alonso, R. Murria-Estal, J. Megías-Vericat, M. Tortajada-Girbés, and E. Alonso-Iglesias. 2011. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis*. 215:475–80.
- Coen, P.M., and B.H. Goodpaster. 2012. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol. Metab.* 23:391–8.
- Corcoran, M.P., S. Lamon-Fava, and R. a Fielding. 2007. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:662–77.
- Declèves, A.-E., Z. Zolkipli, J. Satriano, L. Wang, T. Nakayama, M. Rogac, T.P. Le, J.L. Nortier, M.G. Farquhar, R.K. Naviaux, and K. Sharma. 2014. Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney Int.* 85:611–23.
- Depommier, C. (2013). Etude de l'implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la néphropathie liée à l'obésité dans un modèle murin.
- Doege, H., R. a Baillie, A.M. Ortegon, B. Tsang, Q. Wu, S. Punreddy, D. Hirsch, N. Watson, R.E. Gimeno, and A. Stahl. 2006. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology*. 130:1245–58.



- Eilerman, P. a, C.M. Herzog, B.K. Luce, S.Y. Chao, S.M. Walker, L. a Zarzabal, and D.H. Carnahan. 2014. A comparison of obesity prevalence: military health system and United States populations, 2009-2012. *Mil. Med.* 179:462–70.
- Fabbrini, E., F. Magkos, B.S. Mohammed, T. Pietka, N.A. Abumrad, B.W. Patterson, A. Okunade, and S. Klein. 2009a. Intrahepatic fat , not visceral fat , is linked with metabolic complications of obesity. *Pnas.*
- Fabbrini, E., F. Magkos, B.S. Mohammed, T. Pietka, N.A. Abumrad, B.W. Patterson, A. Okunade, and S. Klein. 2009b. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:15430–5.
- Fabbrini, E., B.S. Mohammed, F. Magkos, K.M. Korenblat, and W. Bruce. 2009c. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *PNAS.* 134:424–431.
- Fabbrini, E., B.S. Mohammed, F. Magkos, K.M. Korenblat, B.W. Patterson, and S. Klein. 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.*
- Fan, N., H. Sun, Y. Wang, L. Zhang, Z. Xia, L. Peng, Y. Hou, W. Shen, R. Liu, and Y. Peng. 2014. Midkine, a potential link between obesity and insulin resistance. *PLoS One.* 9:1–10.
- Fantuzzi, G. 2008. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121:326–30.
- Fernández-Sánchez, A., E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, A. Morales-González, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sánchez-Rivera, C. Valadez-Vega, and J. a Morales-González. 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 12:3117–32.
- Frohnert, B.I., A.R. Sinaiko, F.J. Serrot, R.E. Foncea, A. Moran, S. Ikramuddin, U. Choudry, and D. a Bernlohr. 2011. Increased adipose protein carbonylation in human obesity. *Obesity (Silver Spring).* 19:1735–41.
- Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, and H.F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:2005–10.
- Fujimoto, M., N. Shimizu, K. Kunii, J. a J. Martyn, K. Ueki, and M. Kaneki. 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 54:1340–8.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, and M. Makishima. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114.

- Galinier, A., A. Carrière, Y. Fernandez, C. Carpéné, M. André, S. Caspar-Bauguil, J.-P. Thouvenot, B. Périquet, L. Pénicaud, and L. Casteilla. 2006. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J. Biol. Chem.* 281:12682–7.
- Gavrilova, O., B. Marcus-samuels, D. Graham, J.K. Kim, G.I. Shulman, A.L. Castle, C. Vinson, M. Eckhaus, and M.L. Reitman. 2000. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J. Clin. Invest.* 105:271–278.
- Ge, F., S. Zhou, C. Hu, H.L. Iv, and P.D. Berk. 2010. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin signaling but not in ob / ob or db / db mice. *AJP-Gastrointest Liver Physiol.* 299:855–866.
- Gerner, R.R., V. Wieser, A.R. Moschen, and H. Tilg. 2013. Metabolic inflammation : role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver 1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 872:867–872.
- Gilbert, M., C. Magnan, C. Cruciani-Guglielmacci, and A. Guglielmacci. 2014. Récepteur à l'insuline. Retrieved September 13, 2014, from [http://www.facbio.com/content/index.php?option=com\\_content&task=view&id=71&Itemid=96](http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=71&Itemid=96)
- Go, C.Z., K.T. Uysal, and K. Maeda. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420:333–336.
- Greco, D., A. Kotronen, J. Westerbacka, O. Puig, P. Arkkila, T. Kiviluoto, S. Laitinen, M. Kolak, R.M. Fisher, A. Hamsten, P. Auvinen, and H. Yki-Järvinen. 2008. Gene expression in human NAFLD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294:G1281–7.
- Greenberg, A.S., and M.S. Obin. 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 83:461S–465S.
- Grundy, S.M. 2004. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:2595–600.
- Guilherme, A., J. V Virbasius, V. Puri, and M.P. Czech. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:367–77.
- Hajer, G.R., T.W. van Haeften, and F.L.J. Visseren. 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart J.* 29:2959–71.
- Halberg, N., T. Khan, M.E. Trujillo, I. Wernstedt-Asterholm, A.D. Attie, S. Sherwani, Z. V Wang, S. Landskroner-Eiger, S. Dineen, U.J. Magalang, R. a Brekken, and P.E. Scherer. 2009. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol. Cell. Biol.* 29:4467–83.
- Harano, Y., K. Yasui, T. Toyama, T. Nakajima, H. Mitsuyoshi, M. Mimani, T. Hirasawa, Y. Itoh, and T. Okanou. 2006. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha



- agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int.* 26:613–20.
- Hegele, R. a. 2000. Familial partial lipodystrophy: a monogenic form of the insulin resistance syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 71:539–44.
- Henegar, C., J. Tordjman, V. Achard, D. Lacasa, I. Cremer, M. Guerre-Millo, C. Poitou, A. Basdevant, V. Stich, N. Viguerie, D. Langin, P. Bedossa, J.-D. Zucker, and K. Clement. 2008. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 9:R14.
- Hey-Mogensen, M., J. Jeppesen, K. Madsen, B. Kiens, and J. Franch. 2012. Obesity augments the age-induced increase in mitochondrial capacity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in Zucker fatty rats. *Acta Physiol. (Oxf).* 204:354–61.
- Horowitz, J.F., S.W. Coppack, D. Paramore, P.E. Cryer, G. Zhao, S. Klein, and F. Jeffrey. 1999. Effect of short-term fasting on lipid kinetics in lean and obese women. *Am. Physiol. Soc.* 276:278–284.
- Horton, J.D., H. Shimano, R.L. Hamilton, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1999. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J. Clin. Invest.* 103:1067–1076.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, K. Oshima, Y. Miyata, S. Tanaka, K. Segawa, S. Furukawa, Y. Tochino, R. Komuro, M. Matsuda, and I. Shimomura. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 56:901–11.
- Hotta, K., T. Funahashi, N.L. Bodkin, H.K. Ortmeyer, Y. Arita, B.C. Hansen, and Y. Matsuzawa. 2001. Circulating Concentrations of the Adipocyte Protein Adiponectin Are Decreased in Parallel With Reduced Insulin Sensitivity During the Progression to Type 2 Diabetes in Rhesus Monkeys. *Diabetes.* 50:1126–1133.
- Hübscher, S.G. 2006. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology.* 49:450–65.
- Hugli, O., M. Egli, B. Me, C. Sartori, C. Perrin, P. Nicod, B. Thorens, P. Vollenweider, and U. Scherrer. 2004. Partial Gene Deletion of Endothelial Nitric Oxide Synthase Predisposes to Exaggerated High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Arterial Hypertension. *Diabetes.* 53:2067–2072.
- Hulsmans, M., Geeraert, B., Arnould, T., Tsatsanis, C., & Holvoet, P. (2013). PPAR agonist-induced reduction of Mcp1 in atherosclerotic plaques of obese, insulin-resistant mice depends on adiponectin-induced Irak3 expression. *PloS One*, 8(4), e62253.
- Ibdah, J. a., P. Perlegas, Y. Zhao, J. Angdisen, H. Borgerink, M.K. Shadoan, J.D. Wagner, D. Matern, P. Rinaldo, and J.M. Cline. 2005. Mice Heterozygous for a Defect in Mitochondrial Trifunctional Protein Develop Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Gastroenterology.* 128:1381–1390.

- Jensen, M.D., M.W. Haymond, R.A. Rizza, P.E. Cryer, and J.M. Miles. 1989. Influence of Body Fat Distribution Free Fatty Acid Metabolism in Obesity. *J. clin. Invest.* 83:1168–1173.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, and M. Kasuga. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue , insulin resistance , and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116:1494–1505.
- Kapur, S., S. Bedard, B. Marcotte, C.H. Cote, and A. Marette. 1997. A Novel Role for Nitric Oxide as a Modulator of Insulin Action. *Diabetes.* 47:1691–1700.
- Kapur, S., F. Picard, M. Perreault, Y. Deshaies, and A. Marette. 2000. Nitric oxide : a new player in the modulation of energy metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 24:36–40.
- Kawano, Y., and D.E. Cohen. 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48:434–41.
- Khan, S.A., A. Ali, S.A. Khan, S.A. Zahran, G. Damanhour, E. Azhar, and I. Qadri. 2014. Unraveling the Complex Relationship Triad between Lipids , Obesity , and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014:1–16.
- Khan, T., E.S. Muise, P. Iyengar, Z. V Wang, M. Chandalia, N. Abate, B.B. Zhang, P. Bonaldo, S. Chua, and P.E. Scherer. 2009. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29:1575–91.
- Kim, F., M. Pham, E. Maloney, N.O. Rizzo, G.J. Morton, B.E. Wisse, E. a Kirk, A. Chait, and M.W. Schwartz. 2008. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1982–8.
- Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, H. Ujihara, and T. Koike. 2009. Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. *Proteomics.* 9:4098–101.
- Klötting, N., and M. Blüher. 2014. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15:277–287.
- Korenblat, K.M., E. Fabbrini, B.S. Mohammed, and S. Klein. 2008. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology.* 134:1369–75.
- Kumar, J.V., B. Vishal, and R.K. Nema. 2013. A review on the metabolic syndrome : plethora of disease. *Adv. Pharmacol. Toxicol.* 14:29–42.
- Lacraz, G., K. Couturier, N. Taleux, S. Servais, B. Sibille, D. Letexier, B. Guigas, H. Dubouchaud, X. Leverve, and R. Favier. 2008. Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat. *Int. J. Obes. (Lond).* 32:629–38.



- Lewis, J.S., J.A. Lee, J.C.E. Underwood, A.L. Harris, and C.E. Lewis. 1999. Macrophage responses to hypoxia : relevance to disease mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 66:889–900.
- Loh, K., H. Deng, A. Fukushima, X. Cai, B. Boivin, C. Bruce, B.J. Shields, B. Skiba, L.M. Ooms, N. Stepto, B. Wu, C.A. Mitchell, N.K. Tonks, M.J. Watt, M.A. Febbraio, P.J. Crack, S. Andrikopoulos, and T. Tiganis. 2010. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab.* 10:260–272.
- Lohrmann, D., A. YoussefAgha, and W. Jayawardene. 2014. Trends in body mass index and prevalence of extreme high obesity among Pennsylvania children and adolescents, 2007-2011: promising but cautionary. *Am. J. Public Health.* 104:62–68.
- Luca, C. De, and J.M. Olefsky. 2009. Inflammation and Insulin Resistance. *Febs Lett.* 582:97–105.
- Magnan, C. 2006. Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutr. Clin. Métabolisme.* 20:108–113.
- Mandal, L.K., S. Choudhuri, D. Dutta, B. Mitra, S. Kundu, I.H. Chowdhury, A. Sen, M. Chatterjee, and B. Bhattacharya. 2013. Oxidative stress-associated neuroretinal dysfunction and nitrosative stress in diabetic retinopathy. *Can. J. diabetes.* 37:401–7.
- Mitrou, P., E. Boutati, V. Lambadiari, E. Maratou, V. Komesidou, a Papakonstantinou, L. Sidossis, N. Tountas, N. Katsilambros, T. Economopoulos, S. a Raptis, and G. Dimitriadis. 2010. Rates of lipid fluxes in adipose tissue in vivo after a mixed meal in morbid obesity. *Int. J. Obes. (Lond).* 34:770–4.
- Montell, L.I.A., M. Turini, M. Marotta, M. Roberts, R. Noe, C.J. Ciudad, K. Mace, and A.M. Go. 2001. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:229–237.
- Morinaga , Mayoral , Heinrichsdorff , Osborn , Franck , Hah , Walenta , Bandyopadhyay , Pessentheiner , Chi , Chung , Bogner-Strauss , Evans , Olefsky, O. 2014. Characterization of Distinct Subpopulations of Hepatic Macrophages in HFD/Obese Mice. *Diabetes.* 63.
- Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis. 2005. Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation. *J. Immunol.* 175:6257–6263.
- Nakagawa, T., M. Segal, B. Croker, and R.J. Johnson. 2007. A breakthrough in diabetic nephropathy: the role of endothelial dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:2775–7.
- Nelson, D., and M. Cox. 2008. Principles of biochemistry. p.1158
- Nomiyama, T., Y. Igarashi, H. Taka, R. Mineki, T. Uchida, T. Ogihara, J.B. Choi, H. Uchino, Y. Tanaka, H. Maegawa, A. Kashiwagi, K. Murayama, R. Kawamori, and H. Watada. 2004. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:639–47.

- Odegaard, J.I., and A. Chawla. 2013. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*. 339:172–7.
- Ogden, C., M. Carroll, B. Kit, and K. Flegal. 2014. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA*. 311:806–814.
- Osman, O.S., J.L. Selway, M. a Kępczyńska, C.J. Stocker, J.F. O'Dowd, M. a Cawthorne, J.R. Arch, S. Jassim, and K. Langlands. 2013. A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. *Adipocyte*. 2:160–4.
- Postic, C., and J. Girard. 2008. Science in medicine Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance : lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118:829–838.
- Ribiere, C., a M. Jaubert, N. Gaudiot, D. Sabourault, M.L. Marcus, J.L. Boucher, D. Denis-Henriot, and Y. Giudicelli. 1996. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222:706–12.
- Rossmesl, M., J.S. Rim, R.A. Koza, L.P. Kozak, B. Cbl, and A.K.R.J. Akr. 2003. Variation in Type 2 Diabetes - Related Traits in Mouse Strains Susceptible to Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 52:1958–1966.
- Sartipy, P., and D.J. Loskutoff. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 100:7265–7270.
- Schmitz-Peiffer, C. 2000. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell. Signal.* 12:583–94.
- Schraven, A., J. Langenbach, H.S. Willenberg, and A. Barthel. 2003. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-. *Pnas*. 100:14211–14216.
- Shimano, H., J.D. Horton, I. Shimomura, R.E. Hammer, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1997. Isoform 1c of Sterol Regulatory Element Binding Protein Is Less Active Than Isoform 1a in Livers of Transgenic Mice and in Cultured Cells. *J. clin. Invest.* 99:846–854.
- Shimizu, M., T. Tanaka, and H. Moriwaki. 2013. Obesity and hepatocellular carcinoma: targeting obesity-related inflammation for chemoprevention of liver carcinogenesis. *Semin. Immunopathol.* 35:191–202.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J.D. Horton. 1999. Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus. *J. Biol. Chem.* 274:30028–30032.
- Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine. 2006. Review series Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116:1793–1801.



- Spencer, M., R. Unal, B. Zhu, N. Rasouli, R.E. McGehee, C. a Peterson, and P. a Kern. 2011. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96:1990–1998.
- Stevens, A., and J. Lowe. 1997. *Histologie humaine*. p.408
- Sugita, H., M. Kaneki, E. Tokunaga, M. Sugita, C. Koike, S. Yasuhara, R.G. Tompkins, J.A.J. Martyn, and R.G. Tomp-. 2002. in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *AJP-Endocrinol Metab.* 282:386–394.
- Summers, S. a. 2006. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 45:42–72.
- Sun, K., N. Halberg, M. Khan, U.J. Magalang, and P.E. Scherer. 2013. Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol. Cell. Biol.* 33:904–17.
- De Taeye, B.M. De, T. Novitskaya, O.P. McGuinness, L. Gleaves, M. Medda, J.W. Covington, and D.E. Vaughan. 2007. Macrophage TNF- $\alpha$  contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:713–725.
- Teng, K., C. Chang, L.F. Chang, and K. Nesaretnam. 2014. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats : mechanisms and clinical evidence. *Nutr. J.* 13:1–15.
- Tilg, H., and A.R. Moschen. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 52:1836–46.
- Tormos, K. V, E. Anso, R.B. Hamanaka, J. Eisenbart, J. Joseph, B. Kalyanaraman, and N.S. Chandel. 2012. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 14:537–544.
- Touati, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, L.P. 2011. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese. *Med Sci Sport. Exerc.* 43:398–407.
- Trayhurn, P. 2014. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 34:207–36.
- Trayhurn, P., B. Wang, and I.S. Wood. 2008. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br. J. Nutr.* 100:227–35.
- Tsuchiya, K., H. Sakai, N. Suzuki, F. Iwashima, T. Yoshimoto, M. Shichiri, and Y. Hirata. 2007. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology.* 148:4548–56.
- Van de Voorde, J., B. Pauwels, C. Boydens, and K. Decaluwé. 2013. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism.* 62:1513–21.

- Vankoningsloo, S., Piens, M., Lecocq, C., Gilson, A., De Pauw, A., Renard, P., ... Arnould, T. (2005). Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *Journal of Lipid Research*, 46(6), 1133–49.
- Wang, B., I.S. Wood, and P. Trayhurn. 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Eur. J. Physiol.* 455:479–92.
- West, B., L. Atkinson, B. David, C.N. Boozer, and D.L. Moody. 1992. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am. J. Physiol.* 262:1025–1032.
- Westerbacka, J., M. Kolak, T. Kiviluoto, P. Arkkila, J. Sire, A. Hamsten, R.M. Fisher, and H. Yki-ja. 2007. Genes Involved in Fatty Acid Partitioning and Binding , Inflammation Are Overexpressed in the Human Fatty Liver of Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes*. 56:2759–2765.
- White, P.J., A. Charbonneau, G.J. Cooney, and A. Marette. 2010. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 5:868–878.
- World health Organization. 2014. Obesity and overweight. Retrieved March 14, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Ye, J. 2009. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond)*. 33:54–66.
- Ye, J., Z. Gao, J. Yin, and Q. He. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob / ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 70808:1118–1128.
- Yiannikouris, F., M. Gupte, K. Putnam, and L. Cassis. 2012. Adipokines and Blood Pressure Control. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 19:195–200.
- Yu, Q., F. Gao, and X.L. Ma. 2011. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 89:516–24.
- Zhang, D., Z. Liu, C.S. Choi, L. Tian, R. Kibbey, J. Dong, G.W. Cline, P.A. Wood, and G.I. Shulman. 2007. Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Pnas*.
- Zhao, H.J., S. Wang, H. Cheng, M. Zhang, T. Takahashi, A.B. Fogo, M.D. Breyer, and R.C. Harris. 2006. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:2664–9.